

Tesis de Posgrado

Estudio sobre diferencias genómicas en neoplasias humanas

Rosemblit, Nora

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rosemblit, Nora. (1985). Estudio sobre diferencias genómicas en neoplasias humanas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1909_Rosemblit.pdf

Cita tipo Chicago:

Rosemblit, Nora. "Estudio sobre diferencias genómicas en neoplasias humanas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1909_Rosemblit.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO SOBRE DIFERENCIAS GENOMICAS
EN NEOPLASIAS HUMANAS

por
NORA ROSEMBLIT

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Biologicas

Director de Tesis: Dr. ALBERTO BALDI

1985

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

*Tesis 1909
Ej-2.*

A Hugo y a mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo, por compartir con amor las alegrías, esfuerzos y sinsabores, acompañándome permanentemente.

A mis padres, que me indicaron el camino de la honestidad y esfuerzo como el único valedero, apoyándome con su cariño y aliento en todas las empresas que he iniciado.

A mis hermanos, por su amor y confianza.

Al Dr. Alberto Baldi, quien me formó a nivel profesional con dedicación y empeño, siendo para mí un Director no sólo por haberme enseñado las artes de esta especialidad, sino a través de su ejemplo de rectitud, preocupación y perseverancia. Por haberme honrado con su amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Lidia Thierbach, Ana Rosa Santa Cruz, Héctor Martínez, Sofía Ivanier, Judith Kacowicz, Martín Crespi, Jorge Genovese y Guillermo Castro, por haberlo convertido en un ambiente cálido de amistad y camaradería, compartiendo trabajo, logros y dificultades. En particular, a las licenciadas Sofía Ivanier y Judith Kacowicz, sin cuyo esfuerzo y colaboración no hubiera podido realizar mis investigaciones.

Al Dr. Julio Azcurra, quien como profesor, me enseñó a disfrutar y comprender la Biología desde un enfoque nuevo para mí, como profesional me brindó su ayuda técnica e intelectual, y como consejero de estudios guió mis pasos con interés y real dedicación, preocupándose mucho más allá de la exigencia formal.

A los Dres. Eduardo Charreau y Eduardo Recondo, por haberme iniciado en la rama de la Biología que luego sería mi especialidad, gracias a su claridad y capacidad docente.

A la Fundación Konex, especialmente a la Lic. Rosa N. Cheb Terrab y al Dr. Luis Ovsejevich, por su incondicional ayuda, estímulo y confianza en momentos difíciles de mi carrera.

A la Fundación Bunge y Born, por honrarme con la beca "Julio Poliacoff".

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental, por permitirme realizar mis investigaciones.

A los Institutos Campomar, INGEBI, CEVAN y laboratorios Gador, por su desinteresada colaboración.

INDICE

| | |
|---|-----|
| I. INTRODUCCION..... | 1 |
| II. DESCRIPCION METODOLOGICA | |
| II.1. Fundamentos..... | 28 |
| II.2. Materiales..... | 34 |
| II.3. Métodos..... | 38 |
| III. RESULTADOS | |
| IIIA. Estudio sobre diferencias a nivel genómico de ADNs provenientes de tejidos mamarios humanos normales y tumorales..... | 62 |
| IIIA.1. Análisis por hibridación puntual de ADN con sondas de diferente frecuencia genómica..... | 62 |
| IIIA.2. Hibridación de sonda de diferentes frecuencias genómicas con digeridos de enzimas de restricción | |
| IIIA.2.1. Primera serie de ensayos..... | 78 |
| IIIA.2.2. Segunda serie de ensayos..... | 96 |
| IIIB. Estudio sobre metilación de citosina en ADNs provenientes de células mamarias humanas normales y neoplásicas | 113 |
| IIIB.1. Estudio sobre diferencias en los patrones de distribución de 5mC..... | 113 |
| IIIB.1.1. Primera serie de ensayos..... | 114 |
| IIIB.1.2. Segunda serie de ensayos..... | 120 |
| IIIB.2. Estudio sobre diferencias en el contenido relativo de 5mC en ADNs provenientes de células mamarias humanas normales y neoplasicas..... | 128 |
| IV. DISCUSION..... | 146 |
| V. REFERENCIAS..... | 171 |
| Abreviaturas..... | 185 |

I. INTRODUCCION

Hace casi un siglo que el enigma del cáncer ha sido atacado desde múltiples puntos de vista, pero recién en la última década se ha vislumbrado la posibilidad de integrar la copiosa información acumulada.

Numerosas han sido las teorías postuladas para explicar la o las causas que conducen a la transformación celular, basadas en evidencias experimentales. La diversidad de factores propuestos como causales del cáncer abarca carcinógenos (químicos, radiaciones, factores ambientales), fenómenos inmunológicos, cambios metabólicos, factores hereditarios, alteraciones cromosómicas, virus oncogénicos, entre otros (1 a 12).

Las hipótesis formuladas sobre el origen de la oncogénesis no han sido capaces hasta hace poco tiempo, de integrar totalmente el cúmulo de información acerca de los eventos que ocurren durante la transformación celular.

Quizás la máxima dificultad reside en la confusión de considerar un fenómeno como causa primaria, cuando éste sólo constituye un efecto, un factor desencadenante, o una causa secundaria. Este error, tan sencillo a simple vista, se comprende en toda su magnitud si pensamos en las dramáticas diferencias que existen entre una célula normal y una transformada.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el estable-

cimiento de una neoplasia en un organismo es el resultado de la interacción entre células ya transformadas y su entorno. Dicha interacción consiste no sólo en la influencia de factores específicos del tejido en el cual se desarrolla, sino también a la que ejercen otros sistemas sobre él, como por ejemplo, el sistema inmunológico, el endócrino, etc.

Además, es necesario considerar que para entender profundamente el mecanismo de la transformación, que conduce a las células a dividirse y diferenciarse en forma anómala, se debería conocer también cómo una célula normal controla su propio crecimiento y diferenciación, y desgraciadamente, aún es difícil poder hacerlo.

Dentro de este intrincado panorama, existen numerosas dificultades para establecer la vectorialidad causa-efecto entre múltiples eventos. Sin embargo, la tecnología moderna ha suministrado valiosa información, y ha permitido, al menos parcialmente, la comprensión e interrelación de dichos fenómenos.

Se acepta generalmente que la diferenciación celular de un determinado grupo de células se halla asociado con la actividad de un grupo particular de genes y con la inactividad de otros. Las manifestaciones fenotípicas derivan del carácter genotípico de una célula, y la interacción de ambos componentes es esencial para mantener el estado de normalidad celular.

Ciertos cambios en este equilibrio se asocian con el es-

tado de malignidad de las células.

Sea cual fuere el mecanismo de la transformación, las teorías aceptadas en la actualidad incluyen el concepto de un cambio a nivel del ADN de las células neoplásicas. Como fuera mencionado, dichos cambios podrían ser bien la causa determinante, o un efecto derivado de ella, dentro de la sucesión de múltiples eventos que conducen a la formación de una patología maligna.

Una mejor comprensión del significado de las alteraciones del ADN requiere tener en cuenta la compleja organización del genoma eucariote, caracterizado por la gran heterogeneidad de sus secuencias nucleotídicas (13 a 16), y la regulación de su expresión.

Existen numerosas clasificaciones al respecto, pero en general se acepta la existencia de dos clases fundamentales de secuencias de nucleótidos (17):

a) Secuencias únicas: Son las que están contenidas sólo una vez por genoma haploide. Corresponden aproximadamente hasta al 50% del ADN celular. Su longitud promedio oscila entre 1000-4000 pares de bases (bp). Son también denominadas informacionales, puesto que son, en su mayoría, transcritas a ARNs que luego serán traducidos a polipéptidos o proteínas. Sin embargo, no todas las secuencias informacionales son únicas. Por ejemplo, los genes de histonas se hallan repetidos varias veces por genoma haploide.

b) Secuencias repetitivas: Aparecen varias veces por cada genoma haploide. Se subdividen a su vez en dos categorías:

i) Altamente repetitivas: 10^6 copias por genoma. Se encuentran agrupadas y son relativamente cortas (desde 6 bp hasta varios cientos). Se cree que son componentes estructurales de los cromosomas, localizadas fundamentalmente en posiciones centroméricas y teloméricas de heterocromatina; se desconoce su función (18). Dentro de esta categoría se encontrarían los denominados ADNs satélites. En general no son activas transcripcionalmente, aunque se observó que en algunos casos (19 a 22) se transcriben durante la oogénesis, junto con los genes de histonas, entre los cuales se hallan dispersos.

ii) Moderadamente repetitivas: $10^3 - 10^5$ copias por genoma haploide (14). Se hallan intercaladas con secuencias únicas, y pueden ser cortas o largas. Las primeras pueden tener entre 300 y 200 bp. Forman diferentes familias. Cada familia a su vez, puede poseer entre 10 y 500.000 miembros, es decir, secuencias nucleotídicas semejantes entre sí. La más importante y mejor caracterizada es la familia denominada Alu, puesto que en el centro de su secuencia de 300 bp existe una sucesión de bases, AGCT, capaz de ser reconocida y clivada por la endonucleasa Alu I (23 a 26).

Las secuencias repetitivas largas oscilan entre 5 y 7 Kbp. Algunas son semejantes a los llamados LTR (long ter-

minal repeats) de los proretrovirus. Estas secuencias estarían relacionadas a elementos móviles del genoma, capaces de transponerse, es decir, transportar de un lugar del genoma a otro, a ciertas porciones de ADN.

La distribución de todas estas secuencias varía según la especie, y en general se encuentran intercaladas en determinadas porciones del genoma.

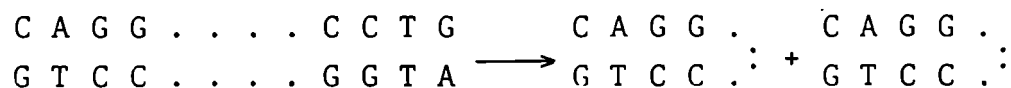
En particular, el ADN humano posee aproximadamente $2,5 \times 10^9$ bp (28) y entre 20 a 30 % de secuencias repetitivas (15, 23).

Al menos el 50% del genoma humano presenta un arreglo llamado de "período corto", en el cual secuencias repetitivas cortas (100 a 300 bp) están intercaladas con secuencias únicas de 2 Kbp aproximadamente.

El ADN humano también contiene otros tipos de arreglos: Entre 6 a 10 % corresponde a ADN satélite (secuencias altamente repetitivas, cortas y en tándem)(13). Existen asimismo secuencias repetitivas de más de 300 bp (28), y largas secuencias únicas, no intercaladas con secuencias repetitivas (29).

Particular interés reviste el estudio de cierto tipo de secuencias repetitivas denominadas palindrómicas o invertidas (30) que poseen una simetría rotacional complementaria de 180° . Vale decir que es por lo tanto posible su comple-

mentaridad intracatenaria, como puede verse en el siguiente ejemplo:



Estas secuencias pueden contener o no secuencias intercaladas, simbolizadas por puntos en el esquema anterior.

Se admite que las alteraciones en las secuencias de ADN inducen cambios en la expresión genética, probablemente suficientes como para generar transformación celular.

Numerosas investigaciones realizadas durante la última década han alentado la presente búsqueda. Cabe citar entre ellas los hallazgos de Jelinek y col. (31), quienes encontraron secuencias invertidas en el ARN heterogéneo nuclear, similares a las medianamente repetitivas del ADN, pero inexistentes en el ARN mensajero maduro. Se verifica así la transcripción de las mismas, sugiriendo estar involucradas en el procesamiento del ARN nuclear. Esto implica la posibilidad de adjudicarles un rol regulatorio en la expresión génica.

Al respecto, Jelinek y col. (13) postulan que estas secuencias repetitivas serían elementos de reconocimiento, involucrados en mecanismos de expresión genética o de ADN parasítico. A su vez, transcriptas tanto en precursores de ARN mensajero como en ARN discreto (27), tendrían movilidad dentro del genoma, como ya fuera indicado. En la actualidad

existe información acerca de su estructura y asociación con secuencias informacionales o únicas, pero aún se desconoce su función, que sería estructural y/o regulatoria.

La idea de la posible existencia de elementos genéticos celulares capaces de activar regiones del ADN por algún proceso de transposición, provee un atractivo modelo para coordinar la expresión de familias de multigenes, o bien de genes simples, reprimidos durante el desarrollo de los diferentes tejidos (27, 32).

Numerosas evidencias han demostrado que, al menos en cierto tipo de enfermedades neoplásicas, la transformación celular se debe a la adquisición de genes con capacidad oncogénica, y fueron denominados por tanto oncogenes. Estos son portados por algunos retrovirus, los cuales hace algunos años fueron señalados como el agente etiológico del cáncer (33, 34). Sin embargo en la última década fue posible dilucidar que los retrovirus actúan tan sólo como vectores de los oncogenes (12, 35 a 38), los cuales en realidad también existen en células normales, como genes celulares. Constituyen los llamados proto-oncogenes, u oncogenes celulares no activados. Su activación por diversos mecanismos (transducción por retrovirus, mutación, aumento de su expresión) lo transformaría en un oncogen propiamente dicho.

Existe la posibilidad de que en algunos casos, los pro-

to- oncogenes se transformen en oncogénicos bajo la influencia de elementos de control de origen viral o celular, los cuales para interponerse involucrarían secuencias invertidas. Ejercerían su acción, por ejemplo, por modificación directa del gen o de su sitio promotor (efecto cis) o bien indirectamente por efecto sobre algún otro gen regulatorio (efecto trans), resultando finalmente un aumento de transcripción de los genes adyacentes. En algunos casos (14), dicha yuxtaposición causa una mutación que impide la transcripción.

Se ha descrito que células transformadas de ratón poseen mayor cantidad de ciertas secuencias repetidas que las normales (39). Por lo tanto la inserción de secuencias repetitivas en determinados loci puede provocar fuertes variaciones fenotípicas (14, 32).

Dado que existen patrones específicos de distribución y dispersión entre los diferentes tipos de secuencias genómicas, la expresión génica diferencial sería, al menos en parte, el resultado de la ubicación específica de determinadas secuencias repetitivas dentro del genoma (32) y cualquier alteración de la misma provocaría variabilidad fenotípica.

Sin embargo el mecanismo descrito no es el único por el cual es posible permitir o modular la expresión de determinados genes.

Entre otros, se postula que la modificación post-replicative de bases en el ADN, como por ejemplo la metilación, está relacionada con la expresión genética (40, 41).

Hace más de treinta años que S. Luria (42, 43) demostró en bacterias la existencia de sistemas enzimáticos capaces de adicionar grupos metilos a la posición 6 de la adenina, ó 5 de la citosina, en ciertas secuencias específicas.

Aunque algunos tipos de bacteriófagos presentan varias bases modificadas (44), el ADN de bacterias y eucariotes posee como únicas bases modificadas 5mC y 6mA (45 a 49). Estos últimos presentan cantidades y distribución intragenómica de 5mC relativamente constantes, lo cual sugiere la existencia de algún rol específico de esta base metilada.

Sin embargo, el ADN bacteriano presenta mayor variación en cuanto a la cantidad y tipo de secuencias en la que ocurre metilación de residuos de citosina (45). Por lo tanto la o las funciones de la metilación en organismos eucarióticos podría ser diferente que en procariontes.

En eucariotes inferiores coexiste la 6mA como base metilada; en vertebrados y plantas superiores, 5mC aparece como el único residuo modificado (49), como así también en ADN de mitocondrias y cloroplastos (50 a 54).

En eucariotes superiores, aproximadamente entre 2 al 7% de los residuos de citosina totales se hallan metilados (46) y esto representa entre el 1 al 3% de la composición total

de bases (45).

Existe también una constancia en eucariotes superiores en cuanto al residuo más frecuentemente encontrado junto a 5mC en dirección 3', guanina, pero no en dirección 5'. Por diversos métodos analíticos fue posible determinar, en ADN proveniente de timo de ternera, células HeLa y erizo de mar, que más del 95% de los residuos de 5mC se encuentra en dirección 3' junto a uno de guanina (49, 55 a 57). Sin embargo es posible encontrar ya sea una purina o pirimidina hacia el extremo 5'. No se determinó aún si, a su vez, el dinucleótido 5'-5mC-G-3' se encuentra adyacente a algún otro residuo en forma constante.

Se demostró asimismo, que entre un 50 a 70% de las secuencias 5'-C-p-G-3' se hallan metiladas en ADN eucariótico (58, 59). Más aún, cada uno de estos sitios, que es complementario simétricamente a sí mismo, se halla siempre metilado en ambas cadenas, o desmetilado en ambas cadenas (60, 61).

Como ya se mencionó, el genoma eucariote está compuesto fundamentalmente por dos tipos de secuencias: a) únicas, las cuales incluyen a la mayoría de los genes estructurales, y b) repetitivas, generalmente no informacionales, y con posible rol regulatorio.

Mediante técnicas apropiadas (que serán detalladas más adelante), es posible separar ambos tipos de secuencias, y

por lo tanto, analizar el contenido de 5mC en cada uno de ellos. Es así que se ha demostrado que las secuencias altamente repetitivas de organismos superiores se hallan enriquecidas en 5mC (62). Un claro ejemplo de ello es citado por Ehrlich y Wang (49), quienes han descripto que en ADN proveniente de hígado humano, la cantidad de citosinas metiladas es el doble en la fracción de secuencias altamente repetitivas en comparación a las cuantificadas en ADN total. Cedar y col. (58) comprobaron en células L murinas, de timo de ternera, y eritrocitos de pollo, que las secuencias CpG se hallan metiladas en un 70% en ADN total, pero sólo 30% en ADN transcripcionalmente activo. En particular, ADN satélite de plantas y animales superiores contiene más 5mC que el resto del genoma (63, 64).

Dado que el ADN satélite se asocia a regiones centroméricas y teloméricas de cromosomas metafásicos, como se indicara, es de esperar que dichas zonas heterocromatínicas estén enriquecidas en 5mC. Efectivamente, anticuerpos dirigidos contra 5mC fueron detectados ligándose específicamente a regiones centroméricas de cromosomas de mamíferos (65, 66), aunque también a algunos focos no centroméricos y a los cromosomas Y de la misma preparación. Sano y Sager (67) demostraron que en ADN satélite bovino, los residuos de 5mC ocurren en grupos, en general dentro de secuencias palindrómicas cortas, y exclusivamente en posición 5' a guanina.

Las secuencias únicas, aunque en menor proporción, también contienen 5mC.

Por otra parte, secuencias que se encuentran repetidas en el genoma, pero que son transcriptas y codifican para el ARN ribosomal, se hallan predominantemente desmetiladas en citosina en mamíferos y aves (48, 68), aunque lo inverso ocurre en eucariotes inferiores (48, 69).

La manera en que el ADN es metilado ha sido exhaustivamente estudiada:

Una vez sintetizada la cadena de ADN, la reacción de metilación ocurre enzimáticamente. Existen en eucariotes superiores metilasas capaces de transferir el grupo metilo de la S - adenosil - metionina a la posición 5' de las citosinas (70).

Estudios realizados sobre varios tejidos de un mismo organismo, demostraron que genes diferentes poseen un patrón de metilación específico de cada tejido en secuencias CpG (71 a 73), y que son heredados clonalmente (74, 75). Se postula que dicho fenómeno podría explicarse si los residuos metilados se heredaran semiconservativamente, y cada cadena hija hemimetilada fuera sustrato para una enzima específica. Esta teoría es consistente con el hecho de que en el ADN, ambas cadenas se hallan simétricamente metiladas o simétricamente desmetiladas. Gruenbaum y col. demostraron la existen-

cia de una enzima eucariote que exclusivamente metila residuos de citosina en el dinucleótido CpG, con una marcada preferencia por ADN hemimetilado como sustrato (59).

El hallazgo de esta denominada "metilasa de mantenimiento", justifica cómo se hereda de célula a célula un patrón de metilación ya establecido, pero no cómo se determinan durante el desarrollo los diferentes patrones específicos de cada tejido. Existen dos modelos posibles para este fenómeno:

a) Una metilasa de "iniciación" podría introducir grupos metilo a una cadena simétricamente no metilada, sólo en ciertos sitios específicos y de acuerdo a un programa en el tiempo. Sin embargo, esta metilación "de novo" sólo ocurre ocasionalmente (49, 52, 53, 54, 76)

b) En un estadio temprano de la diferenciación, todos los sitios CpG se hallarían metilados simétricamente. Durante el desarrollo, selectivamente se programaría una desmetilación de ciertas secuencias, ya sea inhibiendo hemimetilasas o activando desmetilasas específicas de secuencias. Gjerset y Martin (77) encontraron, al menos en células de eritroleucemia murina, una actividad de desmetilasa nuclear, que ocurre aún en ausencia de síntesis de ADN.

La metilación de cadenas recientemente sintetizadas ocurre prácticamente en su totalidad poco después de la duplicación (49, 78),. El tiempo que se emplea para lograr una metilación completa en relación al tiempo de replicación

constituye un punto crítico, puesto que puede determinar la pérdida de residuos de 5mC de secuencias previamente metiladas. En otras palabras, cuanto más tiempo la cadena de ADN recién sintetizada permanezca hemimetilada, mayor es la probabilidad de pérdida de la metilación "de mantenimiento".

Numerosas han sido las funciones atribuidas a la metilación del ADN. Dadas las diferencias cuali y cuantitativas de 5mC existente en procariotes y eucariotes se sugiere que sus roles podrían diferir entre unos y otros (45). Sin embargo, muchos autores extrapolan conclusiones sobre modelos bacterianos para inferir el posible significado de la metilación en organismos superiores. La relativa simplicidad del genoma bacteriano ha permitido demostrar que en este sistema la metilación actúa como señal para evitar la degradación del ADN por acción de enzimas nucleolíticas endógenas (42). Este fenómeno ha sido estudiado especialmente en relación a la eliminación selectiva de un tipo de ADN - generalmente exógeno y proveniente de fagos - en presencia de un segundo ADN , correspondiente a la bacteria huésped, que permanece intacto. Las bases moleculares de este fenómeno corresponden a la presencia de secuencias específicas de 4 a 8 nucleótidos, generalmente palindrómicas, las cuales son reconocidas por enzimas capaces de introducir en ellas un corte en ambas cadenas. Estas enzimas son las denominadas "de restric-

ción", y pueden relacionarse en forma coordinada con actividad de metilasas, constituyendo así un sistema de restricción-modificación. Si la actividad de modificación actúa primero, protege el sitio de reconocimiento de la acción de endonucleasa. Si el ADN no se metila, ambas cadenas son clivadas por ella en el sitio específico. Luego se continúa la degradación por exonucleasas inespecíficas. De esta manera un sistema de restricción-modificación es una poderosa herramienta para eliminar ADNs particulares mientras que otros son conservados.

Por analogía al modelo procariote, se postula que este tipo de sistemas estarían involucrados (41) en el silenciamiento selectivo de ADNs eucarióticos. Tal sería el caso para cromosomas paternos de diversas especies, donde puede observarse que el ADN que será eliminado o que se transformará en heterocromatina presenta un menor grado de metilación.

También por analogía a lo observado en procariotes, se postula que los residuos de 5mC en organismos superiores son sitios "preferidos" de mutación espontánea (79). Esta predisposición a la mutagénesis puede ser el resultado de una conversión a residuos de timina (transición) por desaminación (80). La hipótesis antedicha explicaría parcialmente el enriquecimiento en 5mC de regiones no codificantes en comparación a las informacionales (49, 62): En ADN de vertebrados,

el dinuclótido CpG es menos frecuente de lo que se espera si la distribución de bases ocurre al azar (81). Dado que el código genético es degenerado, los codones conteniendo CpG pueden ser reemplazados por otros para el mismo aminoácido. La inesperadamente baja frecuencia de CpG se corresponde con una elevada frecuencia de CpA y TpG, así como con una elevada metilación en C. Estos valores son consistentes con la idea que los residuos de 5mC tienen una probabilidad inusualmente alta de mutar a timina. La predisposición de pérdida de 5mC por transición indica cuán importante debe ser la metilación en citosina para los eucariotes: de no ser así, hubiera sido eliminada rápidamente por la evolución (49).

En bacterias, es posible reparar mutaciones puntuales producidas por la introducción de un nucleótido equivocado durante la síntesis (mismatch-repair)(82). En E. coli la presencia de 6mA en cadenas parentales regula la reparación preferencial de la cadena recientemente sintetizada. Tal sistema podría ser posible en eucariotes, utilizando 5mC en vez de 6mA como señal para dirigir asimetricamente la reparación de residuos erróneamente incorporados.

La distribución no al azar de los residuos de 5mC a lo largo de cromatina (83), cromosomas metafásicos (65, 66), su relativa abundancia en ADN satélite (64) y altamente repeti-

vo (62) sugiere también una posible relación con la organización del cromosoma.

Sin embargo, sin excluir la posibilidad que alguna o todas las hipótesis antedichas sean verdaderas, la función más generalmente aceptada de 5mC se refiere a su influencia sobre la regulación de la expresión genética.

Evidencias experimentales indican una relación inversa entre la metilación en determinados residuos de citosina y la capacidad del ADN para actuar como templado dirigiendo la síntesis de ARN.

Varias observaciones avalan los posibles mecanismos por los cuales la presencia de 5mC actuaría negativamente sobre la transcripción:

a) El par de bases formado por complementaridad entre 5mC y G es más fuerte que el correspondiente con C (84). Por lo tanto afecta la capacidad del ADN de ser desnaturalizado. Se puede observar un aumento de la temperatura media de fusión (T_m) de un determinado ADN si se metilan total o parcialmente sus residuos de citosina. Puesto que tanto la replicación como la transcripción requieren una separación parcial de las cadenas, la presencia de 5mC podría disminuir ambos fenómenos, sobre todo en regiones ricas en C-G. Se ha postulado que una desaceleración de la velocidad de síntesis de ARN contribuye a la terminación de las cadenas iniciadas

(49). La metilación podría asimismo, inhibir la iniciación de dicha síntesis aumentando la estabilidad de la doble hélice (85), puesto que se observa una mayor abundancia de sitios de iniciación para ARN polimerasa de E. coli en la zona de ADN más fácilmente desnaturalizable.

b) La metilación de ADN afecta también la conformación de la doble hélice, y este cambio podría modular la síntesis de ADN o ARN. Existen evidencias de que, al menos "in vitro" (86), regiones de ADN que contienen CG en forma repetitiva facilitan la adopción de una conformación de doble hélice enrollada hacia la izquierda (conformación Z) en alta fuerza iónica. Sin embargo, la metilación de C promueve el pasaje de la conformación natural (conformación B, enrollamiento hacia la derecha) hacia la conformación Z a concentraciones salinas fisiológicas (87). Aún no se ha dilucidado la influencia de la conformación Z en fenómenos de duplicación y transcripción, pero se puede especular con una posible modificación de su T_m y/o de su capacidad de interactuar con proteínas específicas. Esto último es apoyado por las experiencias de McGhee y col. (88), quienes demostraron que en regiones de conformación Z el ADN es incapaz de formar nucleosomas.

c) La presencia de residuos metilados puede afectar la afinidad por proteínas específicas en determinadas zonas del ADN. Este fenómeno puede ocurrir por un efecto directo, o me-

diado como se indicó en el punto anterior, por la inducción a la conformación Z. Esta hipótesis fue demostrada, al menos en parte recientemente, gracias al hallazgo de una proteína aislada de núcleos de placenta humana, la cual se une en forma preferencial a ADN doblecatenario rico en 5mC (89). Esta proteína denominada MDBP (methyl rich DNA binding protein), es un componente menor de las proteínas que se unen a ADN, y se encuentra en la fracción no histónica cromosomal. No posee actividad de metiltransferasa, endonucleasa ni exonucleasa, y no reconoce estructuras de Z-ADN.

Utilizando anticuerpos policlonales específicos contra 5mC, Ball y col. (90) demostraron que por lo menos el 80% de 5mC se localiza en nucleosomas que contienen histona H₁. Aquellos deficientes en H₁ o ricos en proteínas acídicas de alta movilidad (HMG), contienen ADN hipometilado. Esta asociación preferencial de secuencias metiladas con histona H₁ tiene un significado funcional, puesto que dicha proteína promueve condensación de cromatina (fenómeno asociado a represión génica)(91, 92). Inversamente, las proteínas HMG se relacionan con regiones transcripcionalmente activas, y a zonas de ADN poco metiladas (93).

La interacción de la proteína represora de lactosa de E. coli con el ADN operador, es afectada marcadamente por metilación de un único residuo de citosina (94). Tal vez, genes eucariotes podrían requerir también una región de secuencias

de ADN regulatorias desmetiladas, de tal manera que éstas puedan ligarse a proteínas específicas promotoras de la transcripción. Alternativamente, proteínas capaces de reprimir el proceso de síntesis de ARN podrían presentar una afinidad disminuída por ADN hipometilado (49).

Numerosos grupos de investigadores han estudiado la posible relación entre la expresión de diversos genes y su grado de metilación. Los datos existentes en la literatura no siempre concuerdan al respecto, aunque generalmente se acepta que la hipometilación se asocia con un aumento de la transcripción (58).

La expresión diferencial de genes virales en estado metilado o no, ha sido un modelo experimental ampliamente utilizado para el estudio de este fenómeno:

Virus capaces de infectar células eucarióticas, tales como herpes saimiri (95), adenovirus (76), poliooma (96), herpes simplex (97), SV40 (98), ADN complementario al ARN de MMTV (virus del tumor mamario murino) exógeno (99), y de sarcoma de aves (100), no contienen en forma natural niveles detectables de 5mC. Sin embargo pueden metilarse bajo ciertas condiciones, por ejemplo, al integrarse a cromosomas celulares. Cuando esto ocurre, los provirus endógenos se transcriben en una proporción mucho menor (101, 102), y en general son no-infectivos (49, 88, 103). Inversamente, si se impide

la metilación - utilizando el análogo 5 azacitidina como inhibidor - secuencias virales endógenas no infectivas comienzan a producir viriones (75, 104 a 106), o al menos puede detectarse ARN mensajero específico de alguno de sus genes (73, 95, 107, 108). Analizando luego el ADN que ha sido expresado, se encuentra que se ha hipometilado.

Graessman y col. (109) han descripto que la completa metilación del ADN de virus de poliooma o de SV40, no previene su expresión temprana, aunque el ADN viral extraído de células transformadas o de viriones intactos se halla total o parcialmente desmetilado. Esto implicaría que la metilación es un mecanismo de regulación tardío, o quizás un efecto de la expresión génica temprana, al menos en estos virus.

No sólo se ha empleado el modelo viral, sino también el estudio de genes eucariotes particulares para determinar un aumento de transcripción concomitante con hipometilación. Este fenómeno puede ocurrir en la secuencia informacional propiamente dicha , o también en zonas adyacentes, especialmente en sentido 5'. Lo antedicho fue ampliamente demostrado para los genes de globina: En diferentes tejidos de pollo que no expresan este gen, tales como oviducto, cerebro y eritrocitos embriónicos (72, 110), el grado de metilación es mucho mayor que en eritrocitos adultos, donde sí es activo (aunque no todos los sitios posibles sufran esta variación).

Asimismo se determinó que los genes de globina humanos se hallan hipometilados en determinadas regiones, en aquellos tejidos en los cuales se expresa (75, 111, 112).

Fenómenos similares se reportaron para los genes de ovoalbúmina, conalbúmina, y ovomucoide en pollo (73), antígenos HL en líneas celulares linfoides (113), alfa-feto-proteína en hígado de rata (114), timidina kinasa en líneas celulares de hamster (115), metalo-tioneína en líneas celulares linfoides murinas (116).

El posible control de la transcripción vía metilación del ADN sugiere también su relación con fenómenos de diferenciación celular (117).

Algunas diferencias específicas de tejido en los patrones de metilación génica varían a lo largo del desarrollo:

La infección con retrovirus murino de Moloney en células embrionarias de ratón se bloquea a nivel de la transcripción del provirus. Su metilación "de novo" ocurre en células de carcinoma embrionario, pero no en células de teratocarcinoma diferenciado, las cuales son permisivas (118). White y Parker (119) han reportado cambios durante el desarrollo en el patrón de metilación de los genes de la proteína ligadora de esteroides en próstata de rata. Los genes de la proteína delta sufren hipometilación durante el desarrollo del lente cristalino en pollos (120).

Los estrógenos inducen desmetilación en ciertas regiones del gen de vitelogenina (proteína estrógeno-dependiente), en hígado y oviducto de pollos, y en hígado de Xenopus laevis (121 a 123).

Los diferentes genes de cadena pesada de inmuno-globulinas sufren una desmetilación que acompaña el "cambio de clase" durante el desarrollo (124).

Por otra parte, existen algunos casos en los cuales no se detecta una mayor expresión en genes hipometilados: Se ha demostrado que el nivel de metilación en dos genes de insulina en ratas, no se correlaciona con su expresión diferencial (125). Lo mismo ocurre con el gen de dihidrofolato-reductasa murina (126) y de α -2-colágeno en pollo (127), los cuales poseen dominios 5' hipometilados independientemente de su nivel de expresión.

La existencia de genes con dominio 5' desmetilados no contradice la idea de la interferencia de la metilación del ADN con la transcripción, sino que indica que la ausencia de metilación "per se" no es suficiente para asegurarla. En el caso del gen de vitelogenina antes mencionado, su transcripción luego del tratamiento con estrógenos se asocia con la desmetilación de la región 5'. Lo sorprendente es que este fenómeno es gradual, y en realidad, es posterior al pico de transcripción. Más aún, lo mismo ocurre en oviducto, en

donde no se transcribe el gen (121. 122).

Lo antedicho negaría la hipótesis de que la hipometilación es una precondition necesaria para la transcripción. Por otra parte, ésta implicaría un mecanismo especial para cada gen en particular, lo cual no es muy posible evolutivamente (103). Sería pues más lógico otro mecanismo de control en el cual la activación del gen comenzara cuando el gen se halla aún metilado. La activación conduciría a la desmetilación, la cual a su vez relajaría el control del gen.

Así, la desmetilación no se concibe como un mecanismo para facilitar la activación inicial, sino para simplificar una expresión continua una vez que la activación ocurrió, colocando al gen bajo un mecanismo de control más general.

Si bien no existen aún evidencias directas sobre la influencia que la metilación del ADN ejerce sobre el proceso de transcripción y su relación con la diferenciación celular, los datos hasta aquí expuestos sugieren que dicha hipótesis es altamente probable.

Como fuera mencionado anteriormente, entre las múltiples alteraciones que presentan las células transformadas, cabe citar la expresión anormal de ciertos genes, lo cual quizás conduzca a un crecimiento y diferenciación anómalos.

Es por lo tanto lógico suponer que un patrón de metila-

ción modificado tenga alguna implicancia en la oncogénesis, si bien no puede ser señalado como causa única y primaria.

Esta idea orientó en la última década, la búsqueda de regiones hipometiladas en células eucarióticas transformadas. Los resultados obtenidos favorecen esta suposición (128 a 130), aunque existen discrepancias entre diversos grupos de investigación.

De todas formas, existen aún pocos reportes sobre la determinación y distribución de residuos de 5mC en ADN de células humanas normales y transformadas, los cuales serán discutidos más adelante.

En suma, las alteraciones observadas en los ADNs de células neoplásicas podrían ocurrir a distintos niveles en el complejo genoma eucariote:

- a) A nivel de mutaciones en secuencias informacionales, que codifican polipéptidos o proteínas específicas, las cuales a su vez, desencadenarían una serie de eventos responsables del comportamiento anormal de las células neoplásicas.
- b) A nivel de mutaciones en secuencias reguladoras de la expresión de aquéllas.
- c) A nivel de rearrreglos entre ambos tipos de secuencias.
- d) A nivel de cambios de expresión de secuencias informacionales por su propia modificación o por la de sus regu-

ladoras (metilación).

Estos mecanismos no serían excluyentes, y todos parecen ser válidos, de acuerdo, alternativamente, al modelo experimental utilizado.

El primero ha sido descrito, entre varios casos, en carcinoma de vejiga humano (131 a 133), el segundo en mieloma murino (134), el tercero en linfoma de Burkitt (135), y el cuarto en eritroleucemia de Friend o carcinoma de colon y pulmón humanos (129, 136).

Sin embargo, poco se ha avanzado hasta el presente en relación a neoplasias mamarias humanas.

Se las ha relacionado de alguna manera con virus oncogénicos murinos del tipo C, como el MMTV. Esta formulación se basa en una serie de evidencias experimentales, en las cuales se demostró por microscopía electrónica (137, 138), la presencia de partículas virales semejantes a las del MMTV en secreción láctea de algunas mujeres. Asimismo, se detectó la enzima transcriptasa inversa (139), ARN de 60-70 S, típicos de virus oncogénicos a ARN, y cierta homología en los ácidos nucleicos con el genoma del MMTV (140 a 142) en tumores mamarios humanos.

No obstante, aún no se ha dilucidado definitivamente cuál o cuáles son los cambios que ocurren a nivel del genoma mamario humano transformado.

El presente trabajo se orientó pues hacia la búsqueda de diferencias a nivel genómico en ADNs mamarios humanos tumorales, en relación con su contraparte normal.

Se ha dividido en dos grandes áreas a efectos de una mayor comprensión:

A) Estudio sobre diferencias a nivel genómico de ADNs provenientes de tejidos mamarios humanos normales y neoplásicos.

B) Estudio sobre metilación de citosina en ADNs provenientes de células mamarias humanas normales y neoplásicas.

Por estudios comparativos con su contraparte normal, se determinó que ADNs purificados a partir de tumores mamarios humanos presentan diferencias genómicas a nivel de diversas familias de secuencias nucleotídicas. Para ello, se analizó en ambos tipos de ADN, la distribución de secuencias totales, alta y medianamente repetitivas, utilizando técnicas de hibridación molecular.

Asimismo fue posible demostrar, por análisis densitométricos, que para las primeras, las diferencias observadas se deben -al menos en parte- a un patrón de metilación diferencial, en el cual las células tumorales se hallan hipometiladas con respecto a las normales.

Esta evidencia fue confirmada por la cuantificación, mediante cromatografía líquida de alta presión, del contenido relativo de 5mC en ADN provenientes de tejidos mamarios humanos normales y tumorales, y de la línea celular T47D, derivada de un carcinoma mamario humano.

II. DESCRIPCION METODOLOGICA

II.1. FUNDAMENTOS

El complejo genoma eucariote comprende fundamentalmente dos tipos de secuencias: únicas o informacionales, y repetitivas con posible función regulatoria.

Los diferentes tipos de secuencias pueden ser detectados y aislados mediante técnicas de reasociación molecular (143). Esta metodología utiliza la propiedad de reasociación de dos cadenas de ADN complementarias, previamente desnaturalizadas. El producto de la concentración del ADN (moles de nucleótidos/litro) por el tiempo (segundos) empleados en una reacción de reasociación, se define como "Cot". Este parámetro caracteriza el tipo de secuencia de ADN reasociado: Existe una relación inversa entre el número de veces en que se presenta una determinada secuencia en el genoma, y el valor de Cot al cual es capaz de reasociarse. En otras palabras, secuencias más repetidas se reasocian a valores Cot menores que aquéllas que se encuentran en forma única.

La cinética de reasociación molecular corresponde idealmente a una reacción de segundo orden, dependiendo fundamentalmente del valor Cot. En la práctica, se simplifica su cálculo considerando:

$$Cot = \frac{\text{Absorbancia a 260 nm} \times \text{tiempo (horas)}}{2}$$

Sin embargo, otros factores afectan también la cinética de reasociación. Es así que el aumento de la concentración salina del medio incrementa su velocidad, como así también la longitud de fragmentos de ADN y la temperatura de incubación (143, 144).

Los segmentos de ADN reasociados pueden ser separados de aquéllos que permanecen como simple cadena, luego de una reacción de reasociación a determinado valor de C_{ot} .

Existen diversas estrategias posibles a este fin (143), tales como centrifugación en gradiente de densidad (el ADN simple cadena es más denso que el doblecatenario) en sales de cesio, o adsorción selectiva a diversos compuestos. Entre éstos, los más ampliamente utilizados son filtros de nitrato de celulosa (adsorbe selectivamente ADN monocatenario) y cromatografía de afinidad en hidroxilapatita (HAP). Esta sal de calcio y fosfato, en determinadas condiciones de fuerza iónica y temperatura, retiene selectivamente segmentos de ADN doble cadena, mientras que aquéllos simple cadena son percolados. Los segmentos reasociados pueden ser luego eluidos por aumento de la concentración salina.

Por ejemplo, a 60°C, en bajas concentraciones de buffer fosfato de sodio (PB) (10-30 mM), ambos ADNs mono y bicatenario son adsorbidos a HAP; en condiciones intermedias (0,12 M), se eluyen cadenas simples, mientras que concentra-

ciones altas (0,4 M) son requeridas para la elución de dobles cadenas (145)

Los segmentos monocatenarios pueden ser también eliminados por digestión con nucleasa S_1 (de Aspergillus orizae), la cual en condiciones controladas es capaz de hidrolizarlos sin afectar ADN bicatenario (146).

Mediante una manipulación adecuada de estas metodologías es posible seleccionar secuencias de diferente frecuencia genómica.

Las técnicas de hibridación molecular se emplean para detectar homologías entre ADNs, consistiendo en reacciones de reasociación en las cuales los segmentos desnaturalizados provienen de diferentes fuentes. Asimismo pueden emplearse para detectar homologías entre fragmentos de ADN y ARN.

De acuerdo a las condiciones en que ambas cadenas sean capaces de hibridar, es posible calcular el grado de homología entre ellas.

Se define como "criterio" a la diferencia entre la temperatura media de desnaturalización del ADN (T_m) y la temperatura de incubación de la reacción (143). Cuando ésta se realiza bajo criterio estricto, sólo pueden formarse híbridos con alto grado de homología (generalmente corresponde a incubaciones a altas temperaturas y/o baja fuerza iónica). Si el criterio es no estricto, podrán detectarse también hí-

bridos con bajo grado de homología (temperaturas bajas y/o fuerza iónica elevada).

En la actualidad, la metodología más frecuentemente utilizada para realizar hibridaciones moleculares consiste en inmovilizar una de las cadenas sobre un soporte sólido (generalmente filtros de nitrato de celulosa). E. Southern aplicó esta técnica transfiriendo los filtros fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas específicas (enzimas de restricción) y resueltos por electroforesis en geles de agarosa (147). Los fragmentos contenidos en el gel son desnaturalizados en álcali. Luego éste se pone en contacto directo con el filtro, y los segmentos de ADN son transferidos por un flujo continuo de solución salina concentrada. El ADN monocatenario es fijado sobre el soporte por calentamiento en vacío a 70°C.

La incubación en condiciones apropiadas para reasociación, permite detectar luego los híbridos formados entre el ADN fijado y ARN o ADN marcados radioactivamente, por autoradiografía.

Se debe considerar que cuando una de las cadenas que intervienen en la hibridación se halla fija, la reacción se aleja de la cinética ideal de segundo orden, y no es posible definir el orden de dicha reacción. Por lo tanto, las consideraciones sobre valor Cot expuestas para el caso de reasociación

en fase líquida, no son válidas. Sin embargo es de esperar que las secuencias repetitivas hibriden con velocidad mayor que las únicas.

La obtención de ADN radioactivo (sonda) para estos fines puede llevarse a cabo mediante el empleo del denominado "método de corte-traducción" (nick-translation) (148). Se basa en introducir cortes en una de las cadenas del ADN con ADN-asa I, dejando un extremo 3'OH. A partir de éste, una segunda enzima, la ADN-polimerasa I comienza una reacción de reparación. Por medio de su actividad de 5' exonucleasa, elimina los nucleótidos adyacentes al corte, en forma sucesiva y en dirección 3'. Asimismo va incorporando desde el extremo 3'OH los nucleótidos correspondientes que se encuentren en el medio. Si en éste se coloca al menos uno de los cuatro nucleótidos 5'trifosfato requeridos, marcado en posición α con ^{32}P , será incorporado a la cadena "reparada". Así, puede ser utilizada como sonda en estudios de hibridación molecular.

Las enzimas de restricción antes mencionadas, son endonucleasas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en ADN doble cadena, y las clivan en sitios determinados. La primera de ellas en ser aislada, en 1968, se obtuvo (149) de una cepa de E. coli. En la actualidad, se dispone de numerosas endonucleasas de restricción, provenientes de diversas

especies bacterianas.

En la célula de origen, cada una de estas enzimas, conjuntamente con otra que modifica (por metilación generalmente) la misma secuencia, forman un sistema de modificación-restricción.

De particular interés para el estudio de patrones de metilación son las enzimas de restricción Hpa II y Msp I (aisladas de Haemophilus parainfluenzae y Morixella sp. respectivamente). Conforman un par de isosquizómeros, puesto que reconocen la misma secuencia, C-C-G-G, introduciendo un corte entre los dos residuos de citosina. Sin embargo, Hpa II no escinde el ADN si la citosina interna se halla metilada, mientras que Msp I no puede clivarlo si la citosina externa está metilada (111).

La obtención de patrones electroforéticos de ADN idénticos luego de la digestión con una u otra enzima excluye la posibilidad de que la resistencia al clivaje se deba a la presencia de la secuencia unimetilada. Por el contrario, si existe mayor digestión con alguna de ella, puede atribuirse a la metilación diferencial la desigualdad encontrada.

El grado de metilación de un determinado ADN puede analizarse por determinación del contenido de 5mC. Para ello, es necesario hidrolizar el ADN hasta sus bases, nucleósidos,

o nucleótidos constitutivos, lo cual es posible por medio de digestión enzimática, o hidrólisis ácida controlada. Luego, los componentes del hidrolizado deben ser separados y cuantificados. Actualmente, la compleja tecnología de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) provee una excelente estrategia para ambos propósitos.

II.2. MATERIALES

II.2.1. Tejidos y cultivos celulares

Como fuente de ADN mamario humano, se emplearon biopsias obtenidas de pacientes femeninos en diversos centros asistenciales. Las piezas quirúrgicas fueron sujetas a análisis anátomo-patológicos, consistiendo en carcinomas mamaros primarios, y tejido peritumoral - considerado histológicamente normal - de la misma paciente.

Asimismo se utilizó una metástasis de carcinoma mamario en epiplón.

Todas las piezas quirúrgicas fueron colocadas en hielo seco en el momento de su extracción, y conservadas bajo nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

En estudios de metilación, se empleó también la línea celular T47D, derivada de un carcinoma mamario humano, la cual fue gentilmente provista por la Dra. Iaffa Keydar (Universidad de Tel-Aviv, Israel).

II.2.2. Productos biológicos y reactivos

Enzimas.

-Ribonucleasa pancreática bovina(ARNasa A): Sigma Bio-

Chemicals - Tipo IA.

-ADNasa I y ADN-polimerasa I de E. coli: Amersham.

-Nucleasa S₁ de Aspergillus orizae, Proteinasa K de

Tritirachium album : Boheringer Mannheim.

-Endonucleasas de restricción : Bethesda Research Lab.

Se enuncia a continuación la secuencia y sitio de corte de cada una de las enzimas de restricción empleadas:

Hae III: GG CC

Hind III: A AGCTT

Eco R₁: G AATTC

Pst I : CTGCA G

Xba I : T CTAGA

Sma I : CCC GGG (no corta CC5mCGGG)

Hpa II: CC GG (no corta C5mCGG)

Msp I : CC GG (no corta 5mCCGG)

ADN de fago lambda y ADN de fago ØX174, seroalbúmina bovina libre de nucleasas: Bethesda Research Lab.

ADN de plásmido pBR322: gentilmente cedido por el Instituto de Ingeniería Genética y Biotecnología (INGEBI).

Deoxinucleótidos 5'trifosfato, bases, ADN de testículo de salmón de alto peso molecular, Tris-base, Tris-HCl, Ficoll (PM 400.000), polivinilpirrolidona (PM 360.000), Pipes, SDS, EDTA, Sarkosyl, bromuro de etidio, sero-albúmina bovina fracción IV, Antifoam A: Sigma Biochem.

Sephadex (G 50, G 25): Pharmacia

Hidroxilapatita (grado cromatográfico), agarosa, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato de amonio, DTT, mercapto-etanol (todos grado electroforético): Bio-Rad Lab.

Deoxinucleótidos 5'trifosfato- α ^{32}P .

- dCTP A.E. 400 Ci/mmol : Amersham
- dCTP A.E. 4.000 Ci/mmol: Amersham
- dCTP A.E. 4.200 Ci/mmol: New England Nuclear
- dGTP A.E. 2.500 Ci/mmol: New England Nuclear

Fenol y ácido fórmico : Fischer (fueron bidestilados)

Medios de cultivo y suero fetal bovino: Gibco Lab.

Hidrocloreuro y tiocianato de guanidina (grado ultra puro): Fluka.

Todo otro reactivo utilizado fue de grado analítico
(Mallinkrodt, Merck, Fischer o Carlo Erba).

Filtros de nitrato de celulosa: Schleicher y Schuell BA85.

Placas de autorradiografía: Kodak X-O-Mat AR5

II.2.3. Instrumental

Centrífuga: International modelo B-20

Homogenizadores: Polytron PT-10, Omnimixer Sorvall.

Espectrofotómetros: Beckman modelo DB-G, Hitachi modelo
100-60, Unicam SP-800 adaptado por
J.M. Azcurra y col. (150).

Contadores de centelleo líquido: Beckman modelo LS-100C,
Packard Tricarb, modelo
3320.

Fuente de poder para electroforesis: Pharmacia modelo
EPS-500/400.

Equipo de cromatografía líquida de alta presión:

Waters, gentilmente cedido por Laboratorios Gador.

Cromatógrafo: Modelo ALC/GPC 204

Detector UV: Modelo M-441

Bomba : Modelo 6000 A

Inyector: Modelo UGK

Módulo de datos: Modelo M-730

Columna: de vidrio, preempaquetada, de octadecil-silano unido a sílice, diámetro interno 5 u CGC-C₁₈ (Merck).

II.3. METODOS

II.3.1. Cultivos celulares

Las células T47D fueron cultivadas en monocapas. El medio de cultivo consistió en RPMI 1640, aminoácidos no esenciales 1%, L-glutamina 2 mM, insulina 10^{-7} M, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 mcg, suero fetal bovino 10%. Los cultivos fueron mantenidos bajo atmósfera humidificada de CO₂ 5% en aire, a 37°C.

Las células fueron subcultivadas semanalmente.

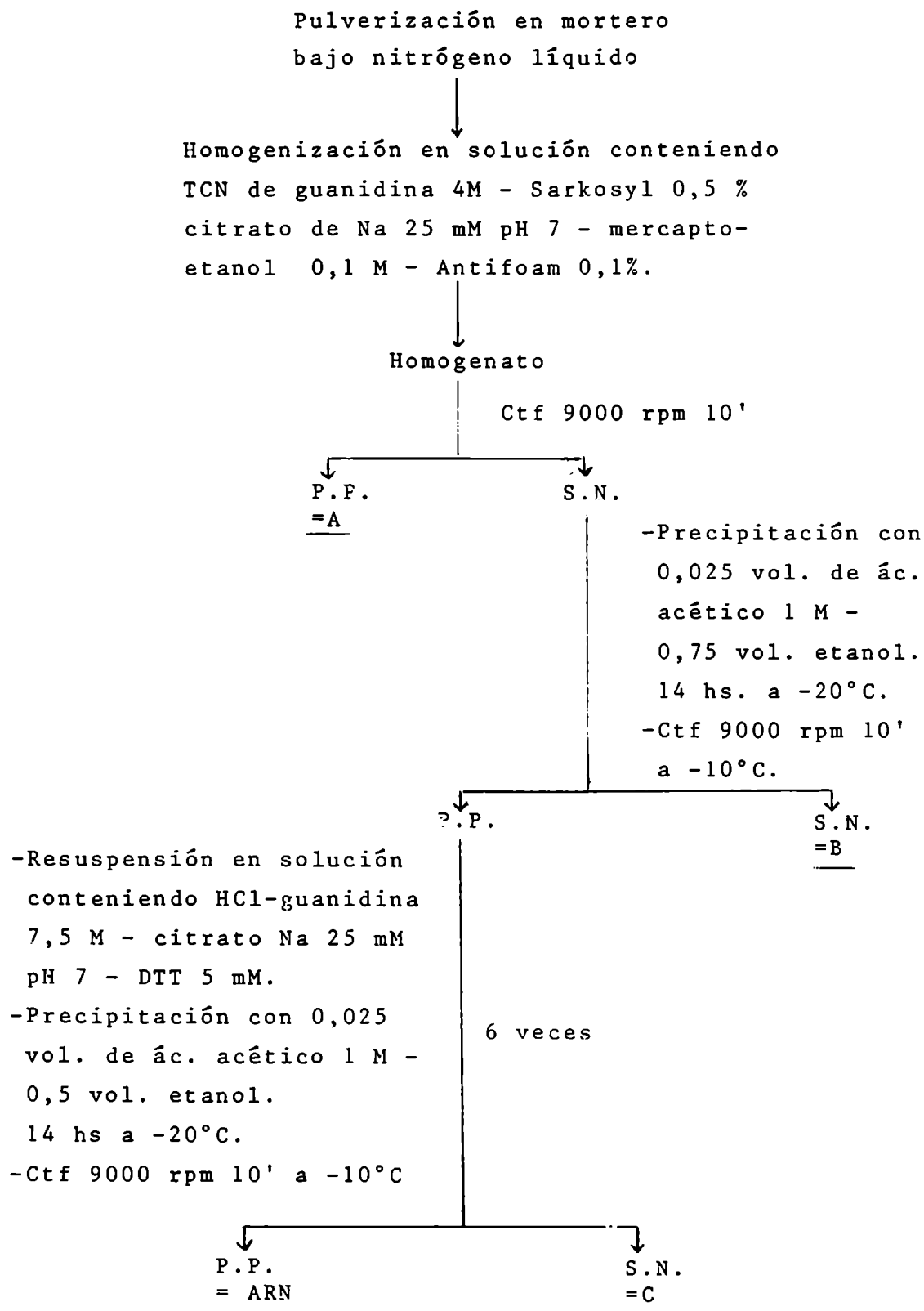
II.3.2. Purificación de ADN

Se utilizaron, en forma alternativa, dos métodos de purificación:

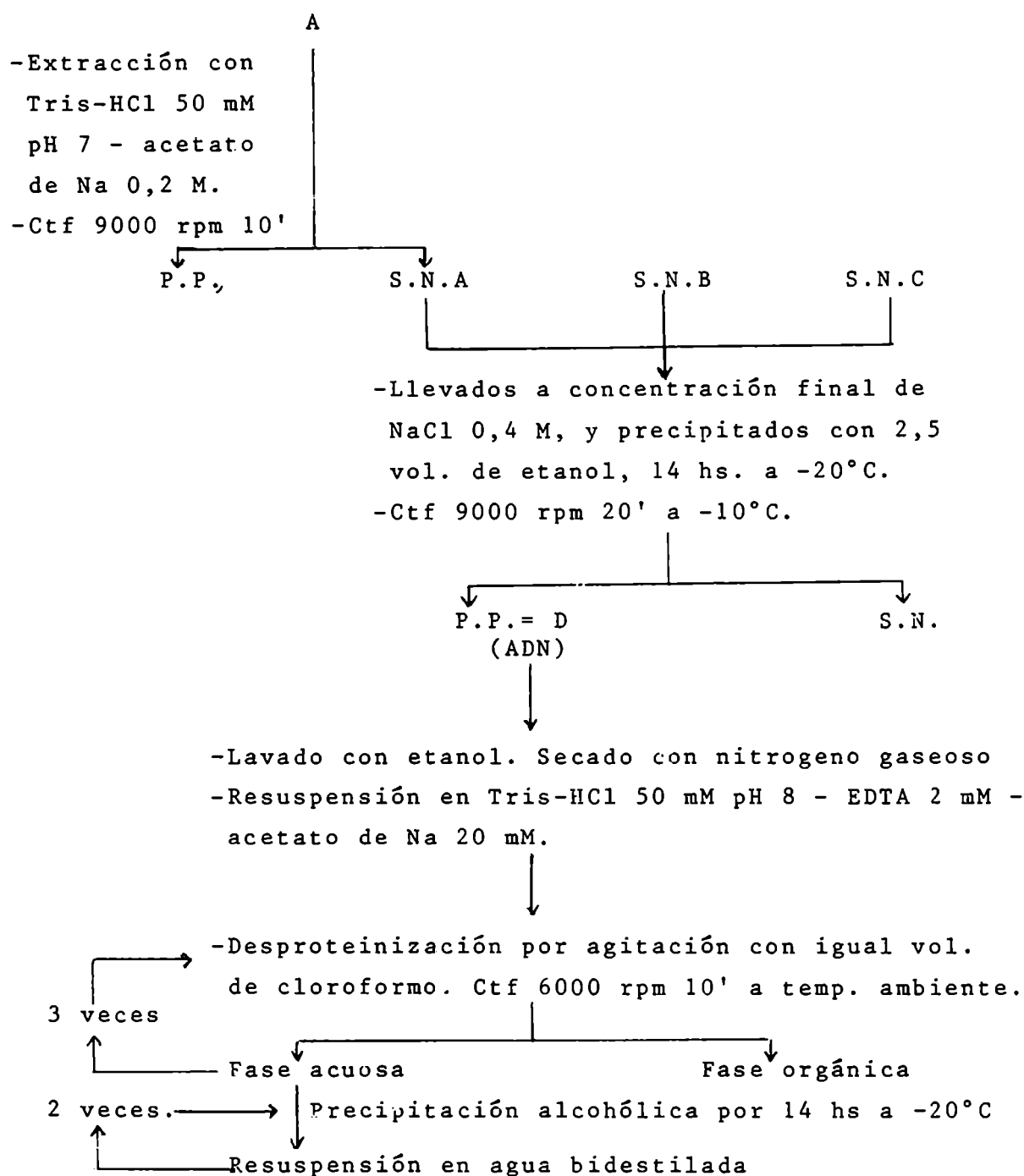
II.3.2.1. Método de purificación de ADN empleando sales de Guanina

dina: Se utilizó con tejidos mamarios humanos, normales y carcinomatosos, de acuerdo al esquema que se muestra a continuación, basado en la técnica de Chirgwin y col (151).

Fue descripta originalmente para la obtención de ARN mensajero, y se resume a continuación:



A, B, y C estaban disponibles en nuestro laboratorio como productos intermedios de purificación de ARN, y fueron utilizados como fuente de obtención de ADN, como se indica seguidamente:



Puesto que este método no se utiliza en forma convencional, se calculó el porcentaje de recuperación del material obtenido, mediante ensayos paralelos empleando cantidades conocidas de ADN purificado a partir de timo de ternera.

Se verificó la naturaleza del mismo, analizando su comportamiento frente a hidrólisis enzimática con ADNasa I, ARNasa A (precalentada a 80°C para eliminar contaminación posible con ADNasas), o hidrólisis alcalina.

Las reacciones de digestión con ADNasa I se realizaron en presencia de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 - $MgCl_2$ 5 mM ; las de digestión con ARNasa A en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, incubándose ambas con 14 ug de la enzima correspondiente, a 37°C, durante 30 minutos. La hidrólisis alcalina se realizó por incubación durante 3 minutos a 100°C en NaOH 0,25 M, neutralizándose posteriormente con HCl 1 N.

El material resistente a la hidrólisis se precipitó en ácido tricloroacético (TCA) 10% frío, en presencia de seroalbúmina bovina (BSA) para co-precipitar. Luego de centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos, se cuantificó el material ácido soluble por absorbancia a 260 nm (A_{260})

Una vez determinada la presencia de ADN en D, se finalizó su purificación por:

- a) hidrólisis alcalina suave: incubación 5 horas a 0°C en NaOH 0,3 N, detenida por agregado de Tris-HCl pH 7 hasta 0,1 M y neutralización con HCl.

- b) hidrólisis con glicosidasas: El ADN obtenido en a), fue precipitado con etanol a -20°C , centrifugado, resuspendido en EDTA 1 mM, y digerido con 50 ug/ml de glicosidasas mixtas durante 1 hora a 37°C , en presencia de acetato de Na 6 M pH 4,8. La digestión se finalizó por neutralización con NaOH 0,1 N.
- c) digestión con proteinasa K: incubación a 37°C por 1 hora en presencia de SDS 0,5%- proteinasa K 100 ug/ml- Tris-HCl 20 mM pH 7- EDTA 2 mM.
- d) desproteinización con cloroformo hasta obtener interfase libre de material orgánico y precipitación de la fase acuosa.

II.3.2.2. Método de purificación de ADN a partir de núcleos: Las biopsias humanas normales y tumorales, conservadas bajo nitrógeno líquido, fueron llevadas a 0°C , temperatura a la cual se homogenizaron con un Polytron en aproximadamente 10 vol. de solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7,8 - EDTA 10-20 mM - NaCl 0,15 M (TNE).

Los núcleos se precipitaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos a 0°C , resuspendieron en solución TNE, y lisaron a temperatura ambiente por agregado de SDS hasta concentración final de 0,5%.

Los ácidos nucleicos se desproteinizaron por sucesivas extracciones fenólicas y clorofórmicas a temperatura ambien-

te, separándose las fases acuosas por centrifugación a 10.000 rpm durante tiempos variables (10-30 minutos, de acuerdo a lo requerido para obtener una buena separación de fases en cada caso). Las interfases obtenidas fueron re-extractadas dos veces cada una, con fase acuosa fresca. Todas las fases acuosas correspondientes a cada muestra se reunieron y sometieron a precipitación alcohólica.

Los ácidos nucleicos fueron colectados por centrifugación a -10°C , 5000 rpm, durante 15 minutos, y resuspendidos en solución conteniendo Tris-HCl 20-50 mM pH 7,5 y EDTA 5-10 mM.

Los ARN se hidrolizaron por digestión con ARNasa A (precalentada a 80°C) en concentración final de 100 ug/ml, durante 1 hora a 37°C .

Las muestras se digirieron luego con proteinasa K (0,1-0,5 mg/ml) a 37°C durante 1 hora, y las trazas de proteína remanente, extraídas con fenol y cloroformo sucesivamente.

Los ADNs fueron precipitados con etanol, centrifugados, y resuspendidos oportunamente en agua bidestilada estéril.

La purificación de ADN a partir de células T47D se realizó básicamente de la misma manera, con la excepción que las células enteras fueron lisadas "in situ" a 37°C durante 1 hora, en placas de Petri (35 mm de diámetro) en las cuales fueron crecidas hasta confluencia. La solución de lisis con-

tenía Tris-HCl 50 mM pH 7,8 - EDTA 5 mM - SDS 0,1% -
proteínasa K 0,5 mg/ml, procediéndose luego de igual manera
que con los núcleos obtenidos de tejidos.

II.3.3. Corte del ADN

II.3.3.1. Corte mecánico: (obtención de fragmentos aptos para
reasociación en fase líquida)(30, 143) Cantidades variables
de ADN fueron llevadas a concentración aproximada de 0,5 mg/ml
en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7,8 - EDTA 10 mM - Na Cl
0,15 M, y fraccionadas mecánicamente en un homogenizador
Omni-Mixer a velocidad máxima, durante 5 minutos, en pulsos
de 30 segundos, a 0°C. Este procedimiento produce fragmentos
de gran tamaño, pero se empleó como método de corte preli-
minar, capaz de disminuir la elevada viscosidad del ADN na-
tivo en solución acuosa. Luego se efectuó el fraccionamien-
to hasta segmentos más pequeños, mediante 60 pasajes forzados
a través de aguja hipodérmica calibre 25-5/8', utilizando
jeringas descartables estériles.

II.3.3.2. Cortes enzimáticos (obtención de fragmentos de tamaños
variables, a ser resueltos por electroforesis).

a) Marcadores de peso molecular: Alícuotas de ADN purifica-
dos de fagos lambda o ØX174, o plásmido pBR322, fueron dige-
ridas con enzimas de restricción en condiciones apropiadas,
incubándose con 1 U.E./mg ADN durante 1 hora a 37°C, dete-

niendo la reacción por el agregado de EDTA, glicerol y azul de bromofenol hasta concentraciones finales de 15 mM, 10% y 0,5% respectivamente.

b) Obtención de fragmentos de restricción de ADNs normales y neoplásicos: Alícuotas de ADNs altamente purificados a partir de tejido mamario humano normal o tumoral, y de la línea celular T47D, fueron digeridas con diversas enzimas de restricción en condiciones apropiadas. En general, se utilizó exceso de enzima en relación a lo indicado por los proveedores para la digestión completa de ADN de fago lambda u otros. Las incubaciones se realizaron en condiciones de esterilidad, extremando dicho cuidado cuando las mismas se llevaron a cabo durante tiempos prolongados.

El grado de digestión obtenido fue monitoreado por electroforesis en geles de agarosa, visualizados por tinción con bromuro de etidio, como se detallará más adelante.

La correcta actividad de la enzima y la ausencia de inhibidores en la mezcla de reacción fueron aseguradas por ensayos preliminares (Controles adicionales serán indicados cuando corresponda).

Las condiciones de incubación para cada enzima de restricción se enumeran a continuación:

- Eco RI: Tris-HCl 50 mM pH 7,5 - $MgCl_2$ 10 mM - NaCl 0,15 M - DTT 1 mM.
- Hae III: Tris-HCl 50 mM pH 7,5 - $MgCl_2$ 5 mM - DTT 0,5 mM.
- Hind III: Tris-HCl 20 mM - $MgCl_2$ 7 mM - NaCl 60 mM.

- Pst I: Tris-HCl 50 mM pH 8 - $MgCl_2$ 10 mM - NaCl 50 mM.
- Xba I: Tris-HCl 6 mM pH 7,4 - $MgCl_2$ 6 mM - NaCl 100 mM.
- Sma I: Tris-HCl 15 mM pH 8 - $MgCl_2$ 6 mM - KCl 15 mM.
- Hpa II: Tris-HCl 20 mM pH 7,4 - $MgCl_2$ 10 mM - DTT 1 mM.
- Msp I: Tris-HCl 50 mM pH 8 - $MgCl_2$ 10 mM - DTT 1 mM.

Todas las incubaciones se realizaron a 37°C durante tiempos variables, en presencia de 100 ug/ml de BSA libre de nucleasas.

Las soluciones de incubación se prepararon concentradas 10 veces, filtradas a través de membranas Millipore 0,45 u, y autoclavadas.

II.3.4. Electroforesis

La electroforesis en geles de poliacrilamida y/o agarosa se realizó con diversos propósitos: determinación de tamaño de fragmentos de ADN cortados mecánicamente, separación de fragmentos de restricción para posterior transferencia a filtros de nitrocelulosa o para fotografía, electroforesis preparativa.

II.3.4.2. Geles de poliacrilamida: Se emplearon geles planos verticales de 13 x 6,5 x 0,2 cm, de poliacrilamida 4% (Acrilamida 30:bisacrilamida 0,8), con gel espaciador de agarosa 0,5%. Las muestras fueron sembradas en presencia de EDTA 15 mM - glicerol 10% - azul de bromofenol 0,5%. El marcador de tamaño molecular fue ADN de fago ØX174 digerido con Hae III. Las corridas electroforéticas se realizaron en solución con-

teniendo Tris-acetato 20 mM pH 7,9 - EDTA 2mM, durante 3 horas a 200V - 40mA. Una vez finalizadas, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (2 ug/ml) y visualizados bajo luz U.V.

II.3.4.2. Geles de agarosa: Se utilizaron geles planos, generalmente horizontales, de dimensiones variables. El porcentaje de agarosa se escogió de acuerdo al tamaño de fragmentos a resolver, entre 0,8 - 3 %. Las muestras fueron sembradas en presencia de solución idéntica a la indicada en el punto anterior. La solución de corrida fue Tris-acetato 20 mM pH 8,3- acetato de Na 1 mM - EDTA 2 mM, y las condiciones de voltaje y tiempo fueron variables.

Los marcadores de peso molecular empleados fueron: ADN de fago lambda digerido con Hind III, de fago ØX174 digerido con Hae III, y de plásmido pBR322 digerido con Hae III.

Los geles fueron luego teñidos en las condiciones anteriores, sometidos a transferencia, o a elución de alguna de sus bandas

II.3.5. Elución de fragmentos de ADN resueltos por electroforesis preparativa

Fragmentos de ADN de 300 y 4000 bp fueron eluidos de geles de agarosa 3% preparativa. Una vez ubicadas las bandas correspondientes, por comparación con ADN de plásmido pBR322

digerido con Hae III, fueron cortadas y procesadas alternativamente de acuerdo a dos metodologías (152):

II.3.5.1. Electroelución: Las bandas del gel conteniendo los fragmentos deseados, fueron colocadas en bolsas de diálisis, junto con una pequeña cantidad de solución de corrida. Una vez cerrada la bolsa, se colocó en la cuba de electroforesis, sumergida totalmente en la solución mencionada, y sometida a electroforesis durante 2-4 horas. Una vez finalizada la elución, se invirtió la polaridad unos segundos para evitar el pegado inespecífico del ADN a la membrana de diálisis. Luego se colectó el líquido contenido en ella, el cual fue dializado y concentrado.

II.3.5.2. Disolución de agarosa en KI: Las bandas del gel conteniendo los fragmentos de ADN deseados, fueron disueltas en 10 vol. de solución saturada de KI - tiosulfato de Na 1 mM, a temperatura ambiente. Una vez disueltas, los segmentos de ADN fueron adsorbidos a HAP pre-equilibrada con KI, a temperatura ambiente, lavando con fosfato de K 0,12 M hasta que la solución de lavado presentara A_{260} nula. Los fragmentos fueron entonces eluidos de la HAP a temperatura ambiente con fosfato de K 1 M, dializados y concentrados.

II.3.6. Reasociación de ADN en fase líquida

II.3.6.1. Desnaturalización: ADN altamente purificado, fraccionado mecánicamente hasta segmentos de longitud apropiada, se desnaturalizó por calentamiento a 100°C durante 10 minutos en Pipes 5 mM pH 6,5, enfriándose luego a 0°C rápidamente.

II.3.6.2. Cálculo de las condiciones de incubación de acuerdo al valor Cot deseado: Los valores Cot se calculan de acuerdo a la expresión:

Cot=Concentración de ADN (moles nucleótidos/l) x tiempo (seg)
o también, de acuerdo a la simplificación:

$$Cot = \frac{A_{260} \times \text{tiempo (horas)}}{2}$$

Sin embargo, ésto sólo es válido cuando la reasociación se realiza en PB 0,12 M (0,18 M Na⁺). En la mayoría de los casos, las concentraciones de las muestras de ADN disponibles hacen que los tiempos de incubación necesarios para obtener el valor Cot deseado, sean impracticables. Para eliminar esta dificultad, la alternativa consiste modificar la concentración de Na en la incubación, lo cual produce variaciones importantes en la cinética de reasociación. Es necesario entonces introducir en la expresión matemática mencionada, un factor de corrección que exprese dicha variación. Ese factor, denominado β , se halla tabulado por Britten (143). Cuando se aplica esta corrección, el término empleado debe

ser el de Cot equivalente (ECot)

$$ECot = \gamma \times Cot$$

Mediante una manipulación adecuada de estas 3 variables (concentración, tiempo y fuerza iónica), se ha reasociado ADN mamario humano a valores de Cot equivalentes a 4×10^{-3} , 70 y 100 moles/l x seg. Los segmentos reasociados utilizando el primer valor, se han definido operacionalmente en el presente trabajo como secuencias invertidas (altamente repetitivas), mientras que los reasociados empleando los dos últimos, se han denominado secuencias repetitivas (medianamente repetitivas).

II.3.6.3. Incubaciones: Fueron realizadas de acuerdo a las condiciones calculadas en el punto anterior. La temperatura fue mantenida a 60°C, permitiendo así sólo la formación de híbridos con alto porcentaje de homología. Para evitar la evaporación, se llevaron a cabo en capilares o tubos de vidrio sellados.

Las reacciones de reasociación fueron detenidas por dilución y/o rápido pasaje por columnas de HAP, y/o agregado de nucleasa S_1 .

II.3.6.4. Digestión con nucleasa S_1 : Fue aplicada para eliminar las porciones de ADN monocatenario residual, una vez finalizada la reacción de reasociación (146). Las condiciones de

incubación fueron: 1 U.E./ug ADN aproximadamente- acetato de Na 25-100 mM pH 4,8 - sulfato de Zn 0,1 mM, durante 1-2 horas a 37°C. Las reacciones se detuvieron por agregado de PB 0,12 M y rápido enfriamiento a 0°C.

Cuando se utilizó esta enzima para digerir ADN radiactivo, las proporciones relativas de enzima y ADN frío para protección óptimas fueron determinadas experimentalmente.

II.3.6.5. Purificación de ADN doblecatenario por cromatografía de afinidad en columnas de HAP: La HAP fue precalentada 10 minutos a 100°C en PB 0,3 M para eliminar la posible afinidad inespecífica (143) y luego empaquetada en columnas mantenidas a 60°C por camisa de agua circulante.

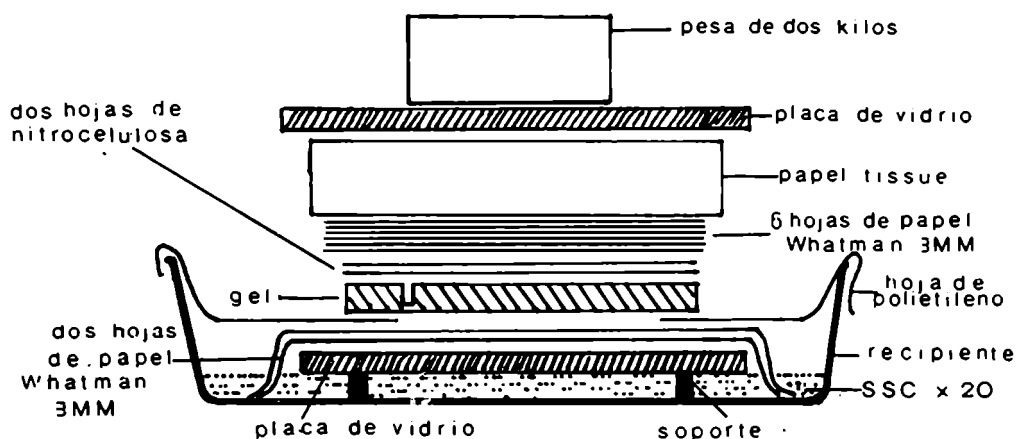
La capacidad de la HAP varía según las condiciones del ensayo y el lote empleado (143). Por lo tanto fue verificada experimentalmente.

La elución fue monitoreada por A_{260} . Previo a la siembra de la muestra, la columna fue lavada hasta obtener A_{260} nula, y equilibrada con PB 0,12 M. Las muestras fueron sembradas en esta fuerza iónica, a la cual la HAP retiene sólo ADN doble cadena, lavándose la columna con PB 0,12 M hasta obtener nuevamente A_{260} nula. El ADN doblecatenario fue entonces eluído con PB 0,4 M, reuniéndose las fracciones que presentaron A_{260} . En todos los casos, la elución fue acelerada presurizando la columna con nitrógeno gaseoso.

II.3.7. Transferencia de fragmentos de restricción a filtros de nitrocelulosa (147, 152)

Finalizadas las electroforesis, los fragmentos de restricción resueltos en geles, fueron desnaturalizados sumergiendo estos últimos en NaOH 0,2 N - NaCl 0,6 N durante 1 hora, neutralizando luego durante 1,5 horas con Tris-HCl 1M pH 7,2 - NaCl 1,5 M, y equilibrando con SSC x 2 (NaCl 0,3 M - citrato de Na 0,03 M) durante 15 minutos. Simultáneamente, se lavaron filtros de nitrato de celulosa de tamaño similar al gel, con agua bidestilada a 60°C durante 15 minutos, y se los equilibró con SSC x 2.

La cuba de transferencia obedece al siguiente esquema: sobre un papel de filtro Whatman 3 MM en contacto directo con SSC x 20, se coloca el gel. Entre ambos, una hoja plástica con una perforación ligeramente menor que el gel, evita la formación de un puente de difusión entre los papeles adyacentes al gel. Sobre éste, se colocan 2 filtros de nitrocelulosa, y 6 papeles de filtro Whatman 3 MM de su mismo tamaño. Por encima de éstos, se sitúan una columna de papel tissue y un peso de dos kilos aproximadamente.



Las transferencias se llevaron a cabo a temperatura ambiente, durante 18-36 horas.

Los papeles de nitrocelulosa en contacto con sendos geles fueron sumergidos luego en NaOH 0,1 N - NaCl 1,5 M durante 20 minutos, neutralizados con Tris-HCl 0,5 M pH 7,4-SSC x 2 durante 10 minutos, y secados en vacío a 80°C por 2 horas.

II.3.8. Siembra puntual de ADN en filtros de nitrocelulosa

Alícuotas idénticas de ADNs purificados de tejido mamario humano normal o tumoral, correspondientes a ADN total, secuencias invertidas y secuencias repetitivas fueron desnaturalizadas en NaOH 0,2 N y neutralizadas con Tris-HCl 2,5 M pH 6,8 (153). La desnaturalización fue asegurada por posterior calentamiento a 100°C durante 5 minutos, seguido por rápido enfriamiento a 0°C.

Cada muestra fue sembrada en forma puntual con un capilar, en un filtro de nitrocelulosa pretratado con SSC x 20. El filtro fue luego calentado en vacío a 80°C durante 2 horas.

II.3.9. Obtención de ADN-sonda marcado radiactivamente

Se aplicó el método de "corte-traducción" ya descrito (148).

Las reacciones se realizaron mediante el empleo de 0,1-2 μ g de ADN tumoral humano, en volúmenes finales que oscila-

ron entre 10 - 100 μ l respectivamente.

Las condiciones finales de incubación fueron las siguientes:

Tris-HCl 50 mM pH 7,5

MgCl₂ 5 mM

ADN polimerasa I 125 U.E./ml

ADNasa I 0,09 U.E./ml

BSA 0,1 mg/ml

glicerol 5%

dGTP, dATP, dTTP 20 μ M

dCTP - α ³²P 2 μ M (en el estudio sobre metilación, se empleó dGTP - α ³²P; por lo tanto en vez de dGTP 20 μ M, la mezcla de reacción contenía dCTP 20 μ M)

La temperatura se mantuvo a 15°C, durante tiempos variables, deteniendo la incubación por agregado de igual volumen de EDTA 0,2 M y posterior extracción con isoamil alcohol - cloroformo (1:24 V/V) (IAC). Las fases fueron separadas por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos.

En algunos casos, se estudió la cinética de incorporación, tomando alícuotas de la reacción a intervalos definidos. Dichas alícuotas fueron diluídas en EDTA 0,2 M, determinando la radiactividad total y TCA 10% precipitable en cada una. Mediante la relación entre ambos valores, se calculó el porcentaje de incorporación correspondiente a cada tiempo de reacción.

Una vez finalizada cada incubación, la radiactividad no incorporada fue separada por cromatografía en columna de Sephadex G-25 ó G-50, eluída con agua bidestilada estéril, y presaturada con ATP y/o ADN de salmón. Las fracciones fueron colectadas en tubos conteniendo 10-20 ug de ADN de salmón, determinándose la radiactividad TCA precipitable y/o total en alícuotas de cada una de ellas. Aquéllas correspondientes al primer pico de elución (volumen de exclusión), fueron reunidas, descartando el resto.

En todos los casos, la radiactividad fue cuantificada por centelleo líquido, en presencia de Bray como solución centellante.

II.3.10. Concentración del ADN

Se utilizaron dos métodos alternativos:

II.3.10.1. Técnica de 2-butanol (154): Se basa en la propiedad higroscópica del 2-butanol. Consiste en agregar volúmenes iguales de 2-butanol a una solución acuosa de ADN, emulsionando por agitación. Las fases son rápidamente separadas por enfriamiento o centrifugación. La fase orgánica superior es descartada, repitiéndose la operación hasta llegar al volumen deseado de fase acuosa. El butanol residual de la misma es extraído 3 veces con éter, el cual se elimina por calentamiento a 45°C durante 15 minutos.

II.3.10.2. Liofilización: Las muestras fueron congeladas en baño de hielo seco y acetona, y liofilizadas hasta obtener el volumen deseado, o hasta sequedad.

II.3.11. Hibridación molecular de ADN en fase sólida

Este tipo de reasociación se realizó entre los diferentes ADN-sonda y los fragmentos fijados sobre papel de nitrocelulosa (147,152, 153, 155).

A fin de evitar la unión inespecífica de la sonda sobre los filtros, se realiza una previa incubación o prehibridación de los mismos, incluyendo asimismo, en las soluciones de prehibridación e hibridación propiamente dicha, ADN heterólogo (salmón) sonificado y desnaturalizado, y solución Denhart (0,02% de polivinilpirrolidona, Ficoll y seroalbúmina bovina). Ambos tipos de incubaciones se llevaron a cabo durante tiempos variables en bolsas de polietileno selladas.

Las hibridaciones se realizaron alternativamente en presencia o ausencia de dextrán-sulfato 10%. Dicho compuesto posee la propiedad de acelerar la reacción, y es particularmente útil cuando se utiliza poca radiactividad. Sin embargo, aumenta la unión inespecífica de la sonda, siendo necesario emplear entonces tratamientos más drásticos para disminuir el efecto de fondo. Cuando se lo incluyó (exclusivamente en la incubación propiamente dicha), las soluciones de prehibridación e hibridación contenían formamida 50%, SSC

x 5 - PB 50 mM - ADN de salmón sonicado y desnaturalizado 250 ug/ml - Denhart x 1-5, siendo la temperatura de ambas de 42°C. Finalizada la reasociación, los filtros se lavaron dos veces con SSC x 2 durante 5 minutos a temperatura ambiente, y tres veces con la misma solución a 65°C durante 15 minutos.

En ausencia de dextrán-sulfato, la solución de pretratamiento contenía SSC x 3 - Denhart x 5 - ADN de salmón sonicado y desnaturalizado 100 ug/ml, mientras que la de incubación SSC x3 - Denhart x 1 - ADN de salmón sonicado y desnaturalizado 60 ug/ml. La temperatura de ambas, como asimismo de los lavados, se mantuvo a 65°C. Una vez finalizada la hibridación, se lavaron los papeles seis veces durante 5 minutos con SSC x 3 - SDS 0,1% - Denhart x 1 - ADN de salmón sonicado y desnaturalizado 60 ug/ml.

En todos los casos, previo a la hibridación, los ADN-sonda se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 10 minutos en presencia de Pipes 5 mM pH 6,5.

La inclusión de ADN mamario humano normal no radiactivo, para aumentar la detección de secuencias específicas de tumor, se indicará cuando corresponde.

En un caso, se reutilizó el filtro de nitrocelulosa sometido a hibridación. Para ello, se eliminó la sonda reasociada lavando dos veces con Tris-HCl 5 mM pH 8 - EDTA 2 mM - pirofosfato de Na 0,05% - Denhart x 0,1, durante dos horas

a 65°C. Se procedió luego a pretratar el filtro y reasociarlo con una nueva sonda en forma habitual (153).

II.3.12. Autorradiografía

Concluída la hibridación y lavados, los filtros de nitrocelulosa fueron secados a temperatura ambiente y autorradiografiados durante tiempos variables. Cuando se incluyó pantallas intensificadoras, la exposición se realizó a -70°C. Caso contrario, se llevó a cabo a temperatura ambiente. El revelado de las placas fue de acuerdo a las instrucciones fijadas por el proveedor.

II.3.13. Fotografía

Geles teñidos con bromuro de etidio fueron fotografiados bajo luz ultravioleta, utilizando filtro rojo, y película Kodak Tri-Pan 400 ASA, revelada como en el punto anterior.

II.3.14. Densitometría

Los patrones de restricción obtenidos con endonucleasas Hpa II o Msp I, y resueltos en geles de agarosa, fueron sometidos a densitometría. Para ello, se utilizó directamente la placa autorradiográfica en el caso en que los fragmentos fueron detectados por hibridación con sonda radiactiva.

Alternativamente, los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados, empleándose los negativos

fotográficos obtenidos.

La imagen correspondiente a cada carril del gel fue cortada, y sometida a densitometría (150) a 590 nm, graficando la escala de absorbancia en unidades arbitrarias.

II.3.15. Hidrólisis del ADN

Alícuotas de ADN altamente purificado de tejido mamario humano normal y carcinomatoso, como así también de la línea celular T47D, fueron hidrolizadas hasta sus bases constitutivas, en ácido fórmico 90%, a 175°C durante 1 hora (156) en capilares de vidrio sellados.

Cada hidrolizado fue evaporado hasta sequedad bajo flujo de nitrógeno gaseoso, y resuspendido en fosfato de amonio 0,1 M pH 4,5 (0,2-1 mg ADN hidrolizado/ml)

II.3.16. Análisis del contenido de 5mC

Las bases obtenidas por hidrólisis de ADN fueron separadas por cromatografía líquida de alta presión, y cuantificadas por A_{280} .

Para este propósito, fue necesario optimizar previamente, en forma experimental, las condiciones cromatográficas. Se ensayaron diversas concentraciones y pH de solvente de elución, fosfato de amonio (157). La eficiencia de cada sistema fue evaluada por el grado de separación obtenido entre los picos de elución correspondientes a bases marcadoras.

Una vez fijadas las condiciones óptimas, 10-50 ul de cada muestra hidrolizada fueron cromatografiados, identificando las bases en relación a los tiempos de retención de los marcadores.

La cantidad presente fue calculada por integración de alturas o áreas comprendidas bajo los picos de elución, corregido por el coeficiente de extinción en el solvente empleado.

El porcentaje relativo de 5mC se expresó como:

$$\% \text{ 5mC} = \frac{\text{5mC}}{\text{5mC} + \text{C}} \times 100$$

II.3.17. Misceláneas

Precipitación alcohólica de ADN: Se realizó siempre con etanol frío. Previo al agregado del alcohol, la solución conteniendo el ácido nucleico se llevó a concentración final de NaCl 0,4 M. El tiempo mínimo de precipitación fue de dos horas, y la temperatura -20°C.

Diálisis del ADN: Se emplearon bolsas de diálisis pretratadas con carbonato de Ca 10% - etanol 50% - EDTA 10 mM. Asimismo, fueron presaturadas con ADN de salmón y/o ATP y lavadas exhaustivamente con agua, para evitar el pegado inespecífico a sus membranas. Las diálisis se realizaron en frío (4°C aproximadamente).

Cuantificación del ADN: El ADN se cuantificó por medio de su absorbancia a 260 nm.

Se consideró $A_{260} = 22 = 1 \text{ mg/ml}$ para ADN bicatenario.

El ADN monocatenario presenta, por el denominado efecto de hipercromaticidad, una absorbancia mayor. Dicho efecto fue estimado en 20% aproximadamente.

Criterio de pureza de ADN: Como criterio de pureza óptima, se consideró:

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = 2$$

Muestras con valores superiores a 1,8 para la relación entre absorbancias a 260 y 280 nm, fueron evaluadas con gráfico de pureza aceptable.

III. RESULTADOS

IIIA. ESTUDIO SOBRE DIFERENCIAS A NIVEL GENOMICO DE ADN_s PROVENIENTES DE TEJIDOS MAMARIOS HUMANOS NORMALES Y TUMORALES

IIIA.1. ANALISIS POR HIBRIDACION PUNTUAL DE ADN CON SONDAS DE DIFERENTE FRECUENCIA GENOMICA

En estos ensayos se investigó si ADN_s purificados a partir de tejido mamario humano normal y neoplásico, presentaban un comportamiento cuantitativamente diferencial frente a ADN-sonda tumoral, de acuerdo al siguiente esquema:

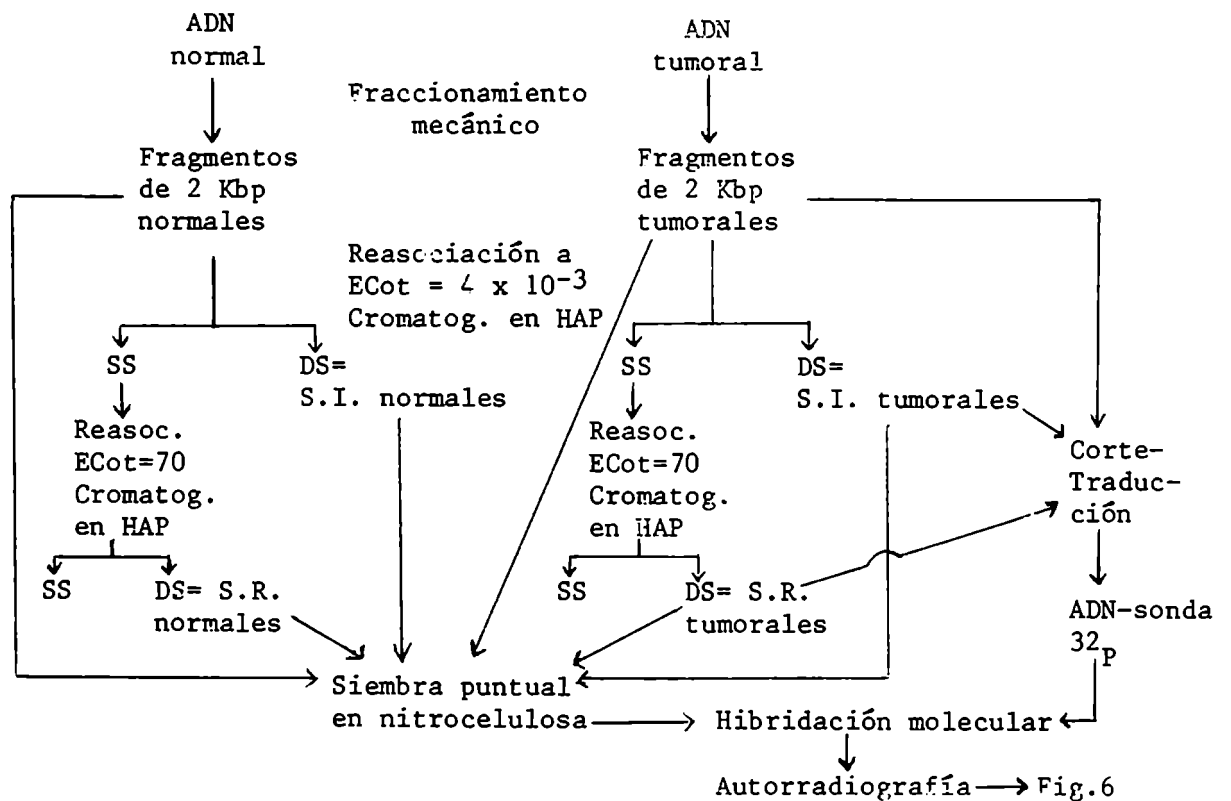


FIGURA 1: Esquema de trabajo

SS=simple cadena DS=doble cadena S.I.=secuencias invertidas
S.R.=secuencias repetitivas.

IIIA.1.1. Purificación de ADN

Se obtuvo ADN de tejidos mamarios humanos, mediante la técnica descrita en II.3.2.1. empleando sales de guanidina, la cual fue diseñada fundamentalmente para la purificación de ARN (151). Por este motivo, se realizaron dos tipos de controles, para verificar la correcta obtención de ADN a partir de fracciones intermedias de la purificación de ARN:

a) Ensayos paralelos de purificación de ADN de timo de ternera, aplicando la misma metodología, revelaron que es posible recuperar aproximadamente un 45% del ADN original (Tabla I)

| FRACCION | VOL. ml | DILU- CION | A ₂₆₀ | A ₂₈₀ | $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ | CONC. mg/ml | mg tota- les. |
|-------------------------------|------------|---------------|------------------|------------------|---------------------------|----------------|------------------|
| Homogen. | 3 | 60 | 0,40 | 0,24 | 1,7 | 1,08 | 3,24 |
| A | 2,1 | 20 | 0,40 | 0,25 | 1,6 | 0,36 | 0,72 |
| B | 2,1 | 20 | 0,11 | 0,07 | 1,6 | 0,10 | 0,21 |
| C | 2,1 | 20 | 0,27 | 0,17 | 1,6 | 0,25 | 0,52 |
| Recuperación A + B + C = 1,45 | | | | | | | |

TABLA I: Recuperación de ADN purificado por el método de sales de guanidina

3,24 mg de ADN de timo de ternera fueron solubilizados en tiocia-

nato de guanidina 4M - Sarkosyl 0,5 % - citrato de Na 25 mM pH 7 - mercaptoetanol 0,1 M - Antifoam A 0,1 %, y tratados de acuerdo al esquema descrito en II.3.2.1. Alícuotas del homogenato, de la fracción A (extraída con 2,1 ml de Tris HCl 50 mM pH 7,8 - EDTA 10 mM), y de las fracciones B y C, fueron diluídas, cuantificando el ADN en cada una de ellas por A_{260} .

b) Mediante hidrólisis alcalina y digestiones enzimáticas con ADNasa I y ARNasa A de alícuotas del material aislado, se verificó la presencia de ADN sin contaminación aparente de ARN en la fracción final (Tabla II)

| | CONTROL | ADNasa | ARNasa | ALCALI |
|---------|---------|--------|--------|--------|
| Blanco | - - | 0,072 | 0,020 | 0,030 |
| Normal | 0,087 | 0,237 | 0,037 | 0,060 |
| Tumoral | 0,093 | 0,418 | 0,038 | 0,047 |

TABLA II: Comportamiento del material purificado frente a hidrólisis enzimática o alcalina

Alícuotas del material purificado a partir de la fracción D (II.3.2.1.) fueron hidrolizadas con ADNasa I, ARNasa A o con NaOH, determinando la A_{260} de la fracción ácido soluble en cada hidrolizado, luego de precipitar con TCA 10% durante 10 minutos a 0°C

Puede observarse que sólo se libera material ácido soluble luego del tratamiento con ADNasa.

Por los resultados obtenidos en los puntos a) y b), se consideró apropiado el método de purificación empleado.

IIIA.1.2. Corte mecánico del ADN

Para su posterior reasociación en fase líquida, ADNs purificados de tejido mamario humano normal y tumoral, fueron fraccionados mecánicamente. El tamaño de los segmentos fue analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida 4%. Para ambos tipos de ADNs, resultaron de $1907 \text{ bp} \pm 100$ (Figura 2)

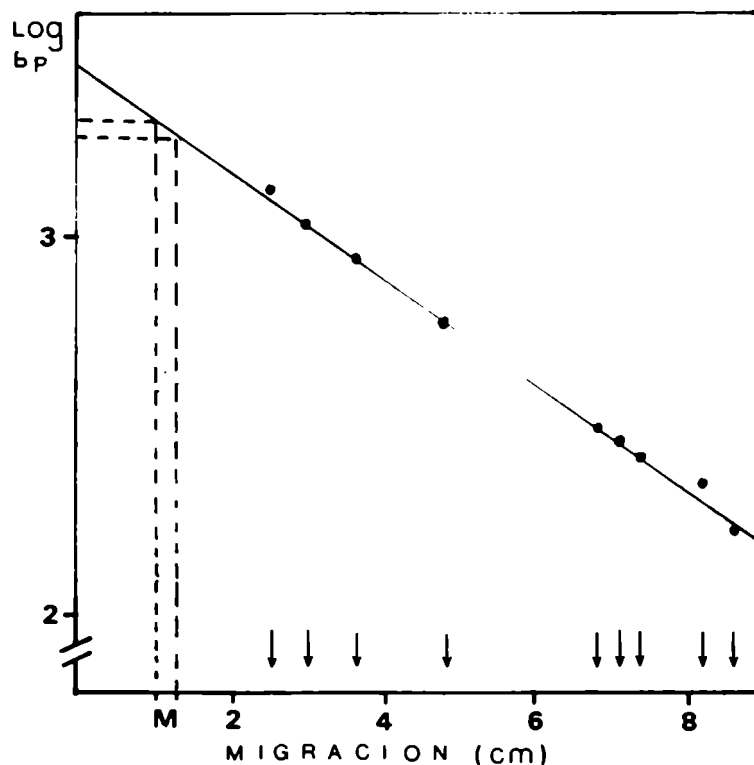


FIGURA 2: Determinación del tamaño de fragmentos obtenidos por cortes mecánicos

Alícuotas correspondientes a 2 μg de ADN normal o tumoral, fraccionados mecánicamente (II.3.3.1.) y concentradas por extracción con 2-butanol (II.3.10), fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida 4% (II.3.4.1.), durante 2,75 horas a 200 V - 40 mA.

Las flechas corresponden a la migración de los fragmentos marcadores (ADN de ϕX174 digerido con Hae III) de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, y 194 bp, de izquierda a derecha respectivamente.

La sigla M indica la migración de los fragmentos de ADN normal y tumoral, coincidente para ambos.

Este tamaño es apto para reasociación en fase líquida. Por lo tanto, este método de fraccionamiento mecánico se repitió en las mismas condiciones previo a cada reasociación en fase líquida

IIIA.1.3. Determinación de la capacidad de unión de HAP

El valor de la capacidad de HAP generalmente aceptado oscila alrededor de los 200 ug ADN/ml HAP (143). Sin embargo, pueden existir variaciones de acuerdo al lote empleado. Por este motivo, se comprobó experimentalmente. El ensayo consistió en adicionar sucesivas alícuotas de ADN de salmón, nativo y cortado hasta 2 Kbp, en concentración de 32 ug/ml, a una columna de 2 ml de HAP (equilibrada con PB 0,12 M) a 60°C. Luego de cada siembra, se lavó con la misma fuerza iónica, monitoreando la A_{260} de las fracciones colectadas. Si al cabo de las sucesivas adiciones se hubiera detectado presencia de ADN a concentración de PB 0,12 M, indicaría que se habría alcanzado la saturación de la columna (Tabla III).

Hasta 680 ug de ADN aproximadamente, fueron sembrados sin obtener A_{260} en los lavados. Al eluirlo con PB 0,4 M se recuperó el 98%. Se concluyó entonces que la relación sugerida de 200 ug ADN/ml HAP, se encuentra dentro del rango de seguridad, bajo las condiciones aquí utilizadas, empleándose en adelante.

| PB 0,12 M | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Fracción Nº | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| ug ADN sembrado | 64 | 128 | 192 | 256 | 320 | 384 | 448 | 512 | 576 | 640 | 680 |
| A ₂₆₀ en lavado | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,03 |

| | | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|
| PB 0,4 M | | | | | | |
| A ₂₆₀ eluída | 1,73 | 2,62 | 2,12 | 0,49 | 0,10 | 0,04 |
| ug ADN eluídos | 165 | 415 | 607 | 653 | 662 | 665 |

TABLA III: Determinación de la capacidad de unión de HAP

Alícuotas de ADN de salmón nativo, cortado en fragmentos de 2 Kbp aproximadamente, fueron sembradas sobre 2 ml de HAP equilibrada con PB 0,12 M. En cada caso se detectó la A₂₆₀ percolada, calculándose el ADN sembrado en forma acumulativa. Se eluyó con PB 0,4 M, colectando fracciones de 2,1 ml, calculando el ADN eluído total por A₂₆₀.

IIIA.1.4. Obtención de fracciones de ADN correspondientes a secuencias invertidas y repetitivas

Se emplearon ADNs altamente purificados a partir de un par de biopsias correspondientes a una misma paciente, los cuales fueron fraccionados mecánicamente. Alícuotas de ambas muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento, procediéndose a reasociarlas a valores Cot apropiados para se-

cuencias invertidas y repetitivas.

En primer lugar, se realizó la reasociación a $ECot = 4 \times 10^{-3}$. La incubación se detuvo separando los segmentos reasociados por cromatografía en columna de HAP. Las fracciones correspondientes a ADN doble cadena y simple cadena fueron dializadas, liofilizadas y resuspendidas en agua bidestilada.

El ADN simple cadena fue reasociado a $ECot = 70$, finalizando la reacción como en el caso anterior. Los segmentos bicatenarios se dializaron, liofilizaron y resuspendieron en agua bidestilada.

La fracción doble cadena de secuencias invertidas tumorales resultó más elevada (30% aproximadamente) que lo esperado. Ello se debió probablemente a que el pasaje por HAP, realizado a una concentración de PB aún más elevada que la de incubación, demoró un tiempo igual o mayor que el empleado para la reasociación en sí. Por lo tanto se repitió dicha reasociación a $ECot = 4 \times 10^{-3}$. A este fin, los segmentos doblecatenarios fueron desnaturalizados en condiciones habituales. Luego se realizó la incubación durante el tiempo requerido, de alícuotas del volumen original en forma sucesiva, las cuales fueron inmediatamente pasadas por la columna de HAP en PB 0,12 M. Una vez retenido en ella todo el ADN bicatenario, fue eluido con PB 0,4 M. El tiempo empleado fue ostensiblemente menor que el de incubación, a su vez más

largo que en la reasociación anterior. Se aseguró así una reacción a $ECot = 4 \times 10^{-3}$. Los fragmentos simple cadena fueron nuevamente reasociados a $ECot = 70$.

Este procedimiento se empleó directamente en el caso de obtención de secuencias invertidas normales.

Las condiciones de reasociación calculadas de acuerdo al valor Cot deseado y la A_{260} de cada fracción, se resumen en la Tabla IV:

| MUESTRA | VOLUMEN FINAL | A_{260} | Cot | CONC. PB | γ | $ECot$ | TIEMPO | TEMPERATURA |
|-------------------|---------------|-----------|-----------------------|----------|----------|--------------------|---------|-------------|
| ADN tumoral (1a.) | 24 ml | 1,65 | $5,73 \times 10^{-3}$ | 0,1 M | 0,6867 | 4×10^{-3} | 25 seg | 60°C |
| ADN tumoral (1a.) | 6 ml | 2,96 | 30,2 | 0,2 M | 2,3146 | 70 | 20,4 hs | 60°C |
| ADN tumoral (2a.) | 22 ml | 0,51 | 4×10^{-3} | 0,12 M | 1,00 | 4×10^{-3} | 56 seg | 60°C |
| ADN tumoral (2a.) | 2,6 ml | 2,51 | 30,2 | 0,2 M | 2,3146 | 70 | 24,1 hs | 60°C |
| ADN normal | 20 ml | 1,10 | 4×10^{-3} | 0,12 M | 1,00 | 4×10^{-3} | 29 seg | 60°C |
| ADN normal | 5,3 ml | 2,28 | 25,1 | 0,23 M | 2,7791 | 70 | 22 hs | 60°C |

TABLA IV: Condiciones de reasociación.

La temperatura fue seleccionada de acuerdo a criterio estricto.

Las condiciones de fuerza iónica, tiempo y volumen de incubación requeridas fueron calculadas de acuerdo a la expresión simplificada

$$\gamma Cot = ECot = \gamma \frac{A_{260} \times \text{tiempo (horas)}}{2}$$

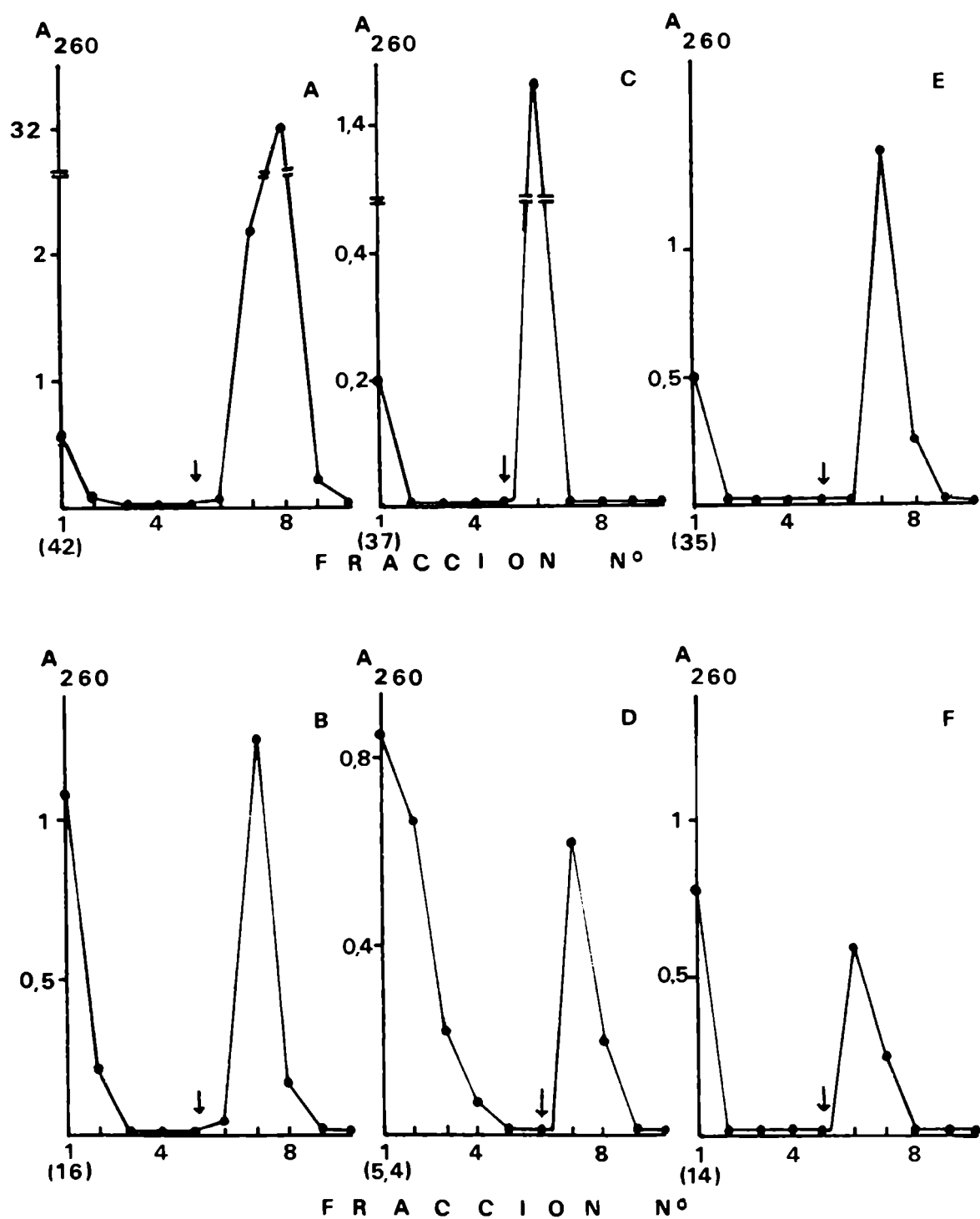


FIGURA 3: Perfiles de elución obtenidos por cromatografía en HAP

Finalizada cada reacción de reasociación, las muestras fueron sembradas en columna de HAP. El ADN simple cadena remanente fue percolado con PB 0,12 M. Se recogió una primera fracción correspondiente al volumen total de la muestra sembrada y algunos ml de lavado con PB 0,12 M. El volumen expresado en ml de esta fracción se indica debajo, entre paréntesis, para cada caso. Los sucesivos lavados se colectaron en fracciones de 2 ml, hasta obtener A_{260} despreciable. A continuación, se eluyó el ADN doblecatenario con PB 0,4M, tomando fracciones de 2 ml.

La flecha señala el comienzo de la elución. La escala de absorbancia se indica en las ordenadas correspondientes para cada caso.

Panel A: Primera reasociación de ADN tumoral a $ECot = 4 \times 10^{-3}$.

Panel B: Primera reasociación de ADN tumoral a $ECot = 70$.

Panel C: Segunda reasociación de ADN tumoral a $ECot = 4 \times 10^{-3}$.

Panel D: Segunda reasociación de ADN tumoral a $ECot = 70$.

Panel E: Reasociación de ADN normal a $ECot = 4 \times 10^{-3}$.

Panel F: Reasociación de ADN normal a $ECot = 70$.

Los paneles B, D y F corresponden a la elución de segmentos obtenidos como ADN monocatenario en los paneles A, C y E respectivamente, reasociados a $ECot = 70$.

La figura 3 ilustra los perfiles de elución obtenidos por cromatografía en columna de HAP.

De acuerdo al contenido de ADN de cada fracción, cuantificado por A_{260} , se calcularon los porcentajes relativos de segmentos mono y bicatenarios obtenidos, como así también su recuperación total (Tabla V).

El porcentaje final de secuencias invertidas tumorales resultó de 7,4%, menor al obtenido para ADN normal. Sin embargo, teniendo en cuenta que la recuperación de ADN luego de la reasociación y purificación por HAP, osciló entre 78 y 89 %, las diferencias entre ADN normal y carcinomatoso disminuyen notablemente (4% aproximadamente). Un razonamiento similar puede aplicarse a las secuencias repetitivas.

Las fracciones correspondientes a la primera y segunda

reasociación de ADN tumoral a ECot = 70 fueron reunidas.

Se procedió entonces a digerir con nucleasa S_1 las secuencias invertidas y repetitivas de ambas muestras, para eliminar posibles regiones de no apareamiento, bajo condiciones descriptas en II.3.6.4..

| MUESTRA | ECot | ADN mg | Doble ug | cadena % | Simple ug | cadena % | DS + mg | SS % |
|----------------|-----------------------------|-----------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|---------|
| ADN tumoral | 4×10^{-3} (1a.) | 1,80 | 510 | 28 | 900 | 50 | 1,40 | 78 |
| ADN tumoral | 70 (1a.) | 0,80 | 138 | 17,3 | 671 | 84 | 0,80 | 100 |
| ADN tumoral | 4×10^{-3} (2a.) | 0,51 | 134 | 26,3 | 320 | 62,7 | 0,45 | 89 |
| ADN tumoral | 70 (2a.) | 0,32 | 74 | 23 | 248 | 77 | 0,32 | 100 |
| ADN normal | 4×10^{-3} | 1,00 | 150 | 15 | 680 | 68 | 0,83 | 83 |
| ADN normal | 70 | 0,50 | 95 | 19 | 410 | 82 | 0,50 | 100 |

TABLA V: Porcentajes relativos de ADN presentes en las diferentes muestras obtenidas por reasociación y cromatografía en HAP

El ADN fue cuantificado por A_{260} . El 100% corresponde a la cantidad de ADN desnaturalizado empleado en cada reasociación. En el caso de ADN monocatenario, se consideró un efecto de hipercromicidad de 20%.

DS = doble cadena; SS = simple cadena.

IIIA.1.5. Siembra puntual en filtros de nitrato de celulosa

Alícuotas de secuencias invertidas, repetitivas, y de ADN total fueron desnaturalizadas como se señaló en II.3.8.

Se sembraron 1,5 y/o 4,5 ug de cada una de ellas en forma puntual, sobre un filtro de nitrocelulosa, mediante el empleo de capilares de vidrio siliconados. Este procedimiento se realizó en forma paralela con ADN normal y carcinomatoso. El filtro fue entonces calentado en vacío, como se indicó en Métodos.

IIIA.1.6. Obtención de sondas marcadas radiactivamente con ^{32}P .

Para el presente ensayo, se marcaron alícuotas de ADN total, secuencias invertidas y secuencias repetitivas, purificadas a partir de tejido neoplásico (1,67, 1,95 y 2,1 ug respectivamente) aplicando el método de corte-traducción (II.3.9.). Los volúmenes de incubación fueron de 100 ul, conteniendo 35 uCi de dCTP- α ^{32}P A.E. 4000 Ci/mmol.

La cinética de incorporación fue monitoreada mediante la determinación de cpm ácido precipitables en alícuotas tomadas de la mezcla de reacción a intervalos sucesivos de tiempo.

Las incubaciones se llevaron a cabo durante 2 hs 20', 2 hs 10' y 1 h 50' para ADN total, secuencias invertidas y secuencias repetitivas respectivamente, deteniendo la reacción por agregado de EDTA y extracción con IAC.

Las curvas de cinética resultantes se ilustran en la figura 4.

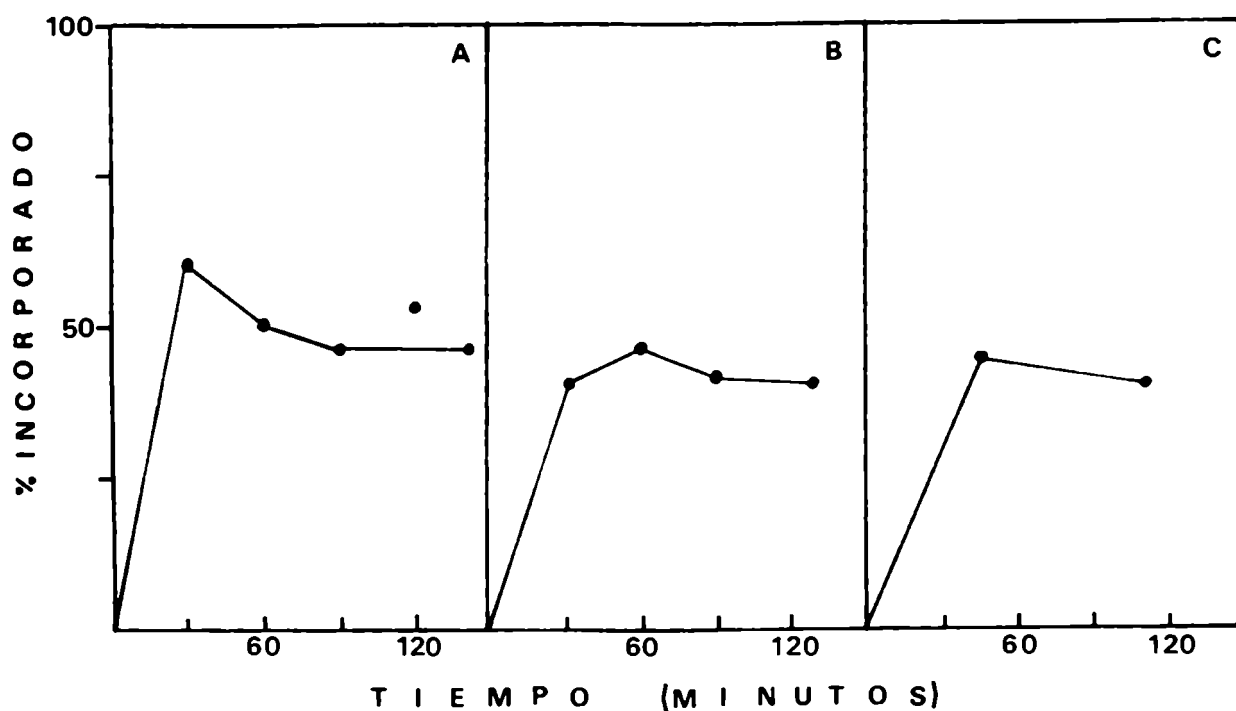


FIGURA 4: Cinética de incorporación de dCTP - α 32 P

Alícuotas correspondientes a 1,67, 1,95 y 2,1 ug de ADN total, de secuencias invertidas y de secuencias repetitivas tumorales, respectivamente, fueron incubadas en un volumen final de 100 ul, bajo condiciones descritas en II.3.9.

A los minutos indicados en cada gráfica, se tomaron aproximadamente 0,1 ul de la mezcla de reacción, diluyéndolas en 200 ul de EDTA 0,2M. Las cpm totales fueron cuantificadas en 40 ul de la dilución. Las cpm ácido precipitables se determinaron por agregado de 1 ml de TCA 10% a 40 ul de la dilución mencionada, en presencia de 50 ug de ADN de salmón para coprecipitar, a 0°C durante 10 minutos. El material ácido insoluble fue retenido por filtración al vacío sobre filtros de fibra de vidrio. Una vez secos, se cuantificaron las cpm retenidas.

El porcentaje de incorporación se expresó como

$$\% = \frac{\text{cpm TCA-precipitables}}{\text{cpm totales}} \times 100$$

Panel A: ADN total

Panel B: secuencias invertidas

Panel C: secuencias repetitivas

La radiactividad no incorporada fue separada por cromatografía en columna de Sephadex G-25, de acuerdo con los siguientes perfiles de elución:

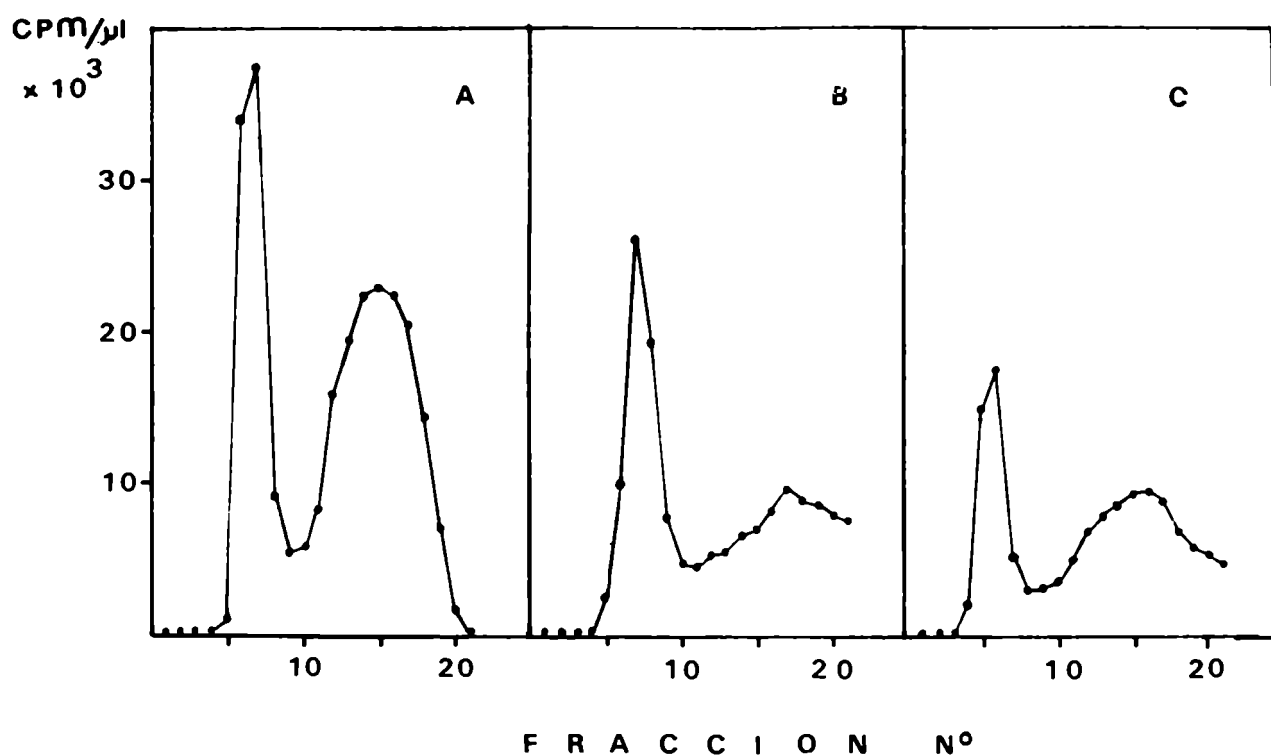


FIGURA 5: Perfiles de elución en Sephadex G-25

Finalizadas las incubaciones de incorporación, la radioactividad libre fue eliminada por cromatografía en columna de Sephadex G-25. La elución se llevó a cabo con agua bidestilada estéril, recogiendo fracciones de 0,4 ml aproximadamente, y cuantificando las cpm correspondientes a alícuotas de 1 ul de cada una de ellas.

Panel A: ADN total

Panel B: Secuencias invertidas

Panel C: Secuencias repetitivas.

El primer pico de elución coincidió con el volumen de exclusión, determinado previamente. Fue considerado como ADN- ^{32}P , y utilizado en los siguientes ensayos de hibridación molecular.

Las actividades específicas obtenidas fueron de $2,26 \times 10^7$, $1,1 \times 10^7$ y $7,5 \times 10^6$ cpm/ug ADN, para ADN total, secuencias invertidas y repetitivas respectivamente.

IIIA.1.7. Hibridación molecular de ADN en fase sólida

Los filtros de nitrocelulosa conteniendo siembras puntuales de ADN total y/o secuencias invertidas y/o secuencias repetitivas fueron prehibridizados durante 15 horas a 42°C , e hibridados en presencia de dextrán-sulfato. Para aumentar la posible detección de secuencias tumor-específicas, se incluyó 100 ug aproximadamente de ADN normal, sonificado y desnaturalizado, no radiactivo en la mezcla de incubación.

El filtro conteniendo secuencias invertidas fue hibridado con la sonda homóloga durante 20 horas; el filtro conteniendo secuencias repetitivas, con la sonda de igual tipo, durante 21 horas, mientras que aquél conteniendo las tres fracciones diferentes, se hibridó con sonda de ADN total por 22 horas.

Finalizadas las incubaciones, los filtros fueron lavados, secados y expuestos a placas autorradiográficas durante 3 días, en presencia de pantalla intensificadora.

La imagen autorradiográfica obtenida se reproduce a continuación:



FIGURA 6: Hibridación en forma puntual con ADN-sondas tumorales total, secuencias invertidas y secuencias repetitivas

Luego de ser desnaturalizadas, alícuotas correspondientes a secuencias invertidas, repetitivas y ADN total, normales y neoplásicas, fueron sembradas en forma puntual sobre filtros de nitrocelulosa e hibridados con ADN-sonda $-^{32}\text{P}$ de secuencias tumorales, detectando los híbridos por autorradiografía.

Panel A: Hibridación de sonda de ADN tumoral total con secuencias invertidas

Panel B: Hibridación de sonda de ADN tumoral total con secuencias repetitivas.

Panel C: Hibridación de sonda de ADN tumoral total con ADN total.

Panel D: Hibridación de sonda de secuencias invertidas tumorales con secuencias invertidas.

Panel E: Hibridación de sonda de secuencias repetitivas con secuencias repetitivas.

En todos los casos, la columna de la izquierda corresponde a siembras de ADN tumoral, y la de la derecha, a ADN normal. La siembra superior fue de 1,5 ug, y la inferior de 4,5 ug, con excepción del panel E, en el cual se realizó esta última únicamente.

En todos los paneles, las cantidades sembradas de ADN tumoral (columna izquierda) y normal (columna derecha) fueron idénticas.

Comparando la serie neoplásica con su contraparte normal, no pudieron observarse diferencias significativas en la cantidad de híbridos formados con la sonda de ADN total.

Sin embargo, al enfrentar la sonda de un determinado tipo de secuencia con la misma especie en el papel, fue posible detectar una mayor reasociación con la serie tumoral que con la normal. Tal es el caso de la sonda de secuencias invertidas (panel C) y de secuencias repetitivas (panel D).

Estas evidencias preliminares alentaron una búsqueda orientada a detectar diferencias cuali y/o cuantitativas con mayor grado de definición.

IIIA.2. HIBRIDACION DE SONDA DE DIFERENTES FRECUENCIAS GENOMICAS CON DIGERIDOS DE ENZIMAS DE RESTRICCION

IIIA.2.1. Primera serie de ensayos

Se realizó para detectar diferencias cuali o cuantitativas en el comportamiento hibridable de sondas de ADN tumo-

rales, de secuencias totales o invertidas, frente a fragmentos de restricción de ADN normal y neoplásico, resueltos por electroforesis y transferidos a filtros de nitrocelulosa, según el siguiente esquema de trabajo:

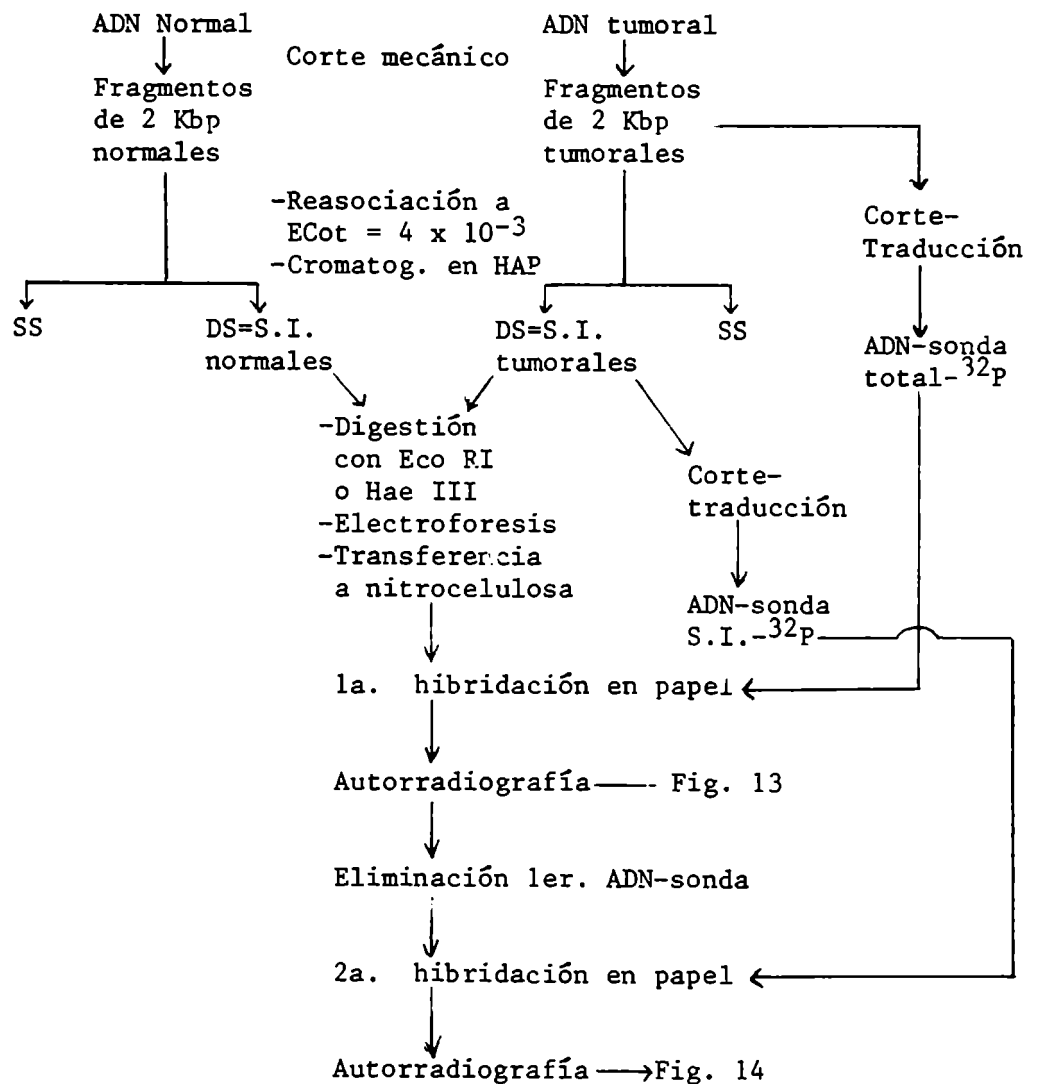


FIGURA 7: Esquema de trabajo

SS=simple cadena DS=doble cadena
S.I.=secuencias invertidas

IIIA.2.1.1. Purificación y corte mecánico del ADN

En el presente estudio, se empleó un segundo par de biopsias mamarias humanas, tumoral y peritumoral (normal), provenientes de una misma paciente.

Se aplicó nuevamente el método de purificación de sales de guanidina.

Una vez purificados, los ADN fueron cortados mecánicamente mediante 60 pasajes forzados a través de aguja hipodérmica.

IIIA.2.1.2. Obtención de fragmentos de restricción y transferencia a filtros de nitrato de celulosa

Los ADN así obtenidos fueron digeridos con las endonucleasas Eco RI o Hae III (1 U.E./mg ADN) en condiciones enunciadas previamente (II.3.3.2), durante 1 hora a 37°C.

Los digeridos fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 1,6% y transferidos a papel de nitrocelulosa por 18 horas.

IIIA.2.1.3. Obtención de ADN sonda de secuencias tumorales totales e invertidas

a) Secuencias totales: 1,1 ug de ADN neoplásico purificado y cortado mecánicamente, fueron incubados en un volumen final de 100 ul, conteniendo 100 uCi de dCTP- α ³²P, A.E. 400 Ci/mmol, según las condiciones especificadas en II.3.9.

Se estudió la cinética de incorporación por cuantificación de cpm ácido-precipitables en alícuotas tomadas a intervalos de 45 minutos (Figura 8)

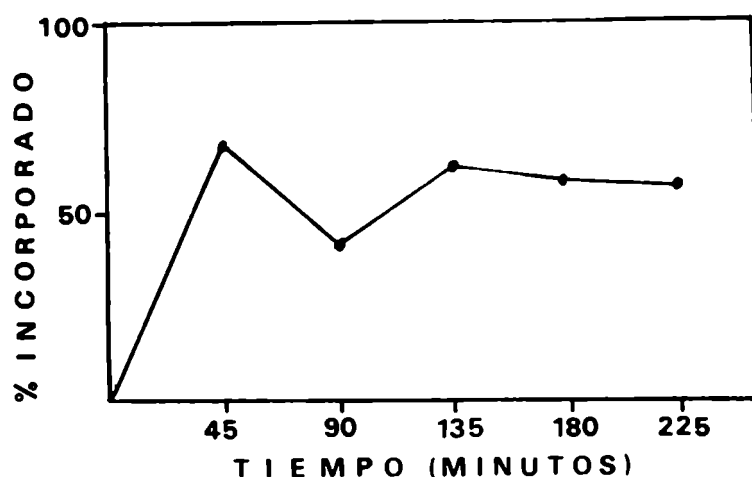


FIGURA 8: Cinética de incorporación de dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$ a ADN tumoral total

1,1 ug de ADN neoplásico fueron incubados en un volumen final de 100 ul, en presencia de 100 uCi de dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$. Cada 45 minutos, se tomó una alícuota de aproximadamente 0,25 ul, la cual fue diluída en 100 ul de EDTA 0,2 M. Se determinó las cpm totales en 40 ul de la dilución. La radiactividad ácido insoluble fue cuantificada en igual volumen precipitado previamente con 2 ml de TCA 10%, en presencia de 50 ug de ADN de salmón para coprecipitar, a 0°C durante 10 minutos. El material insoluble fue retenido sobre filtros Millipore para su cuantificación.

El porcentaje de incorporación se expresó como:

$$\% = \frac{\text{cpm TCA-precipitables}}{\text{cpm totales}} \times 100$$

Al cabo de 225 minutos se detuvo la reacción, alcanzando una incorporación de 57%.

La radiactividad libre se separó por cromatografía en columna de Sephadex G-25, obteniendo el siguiente perfil de elución:

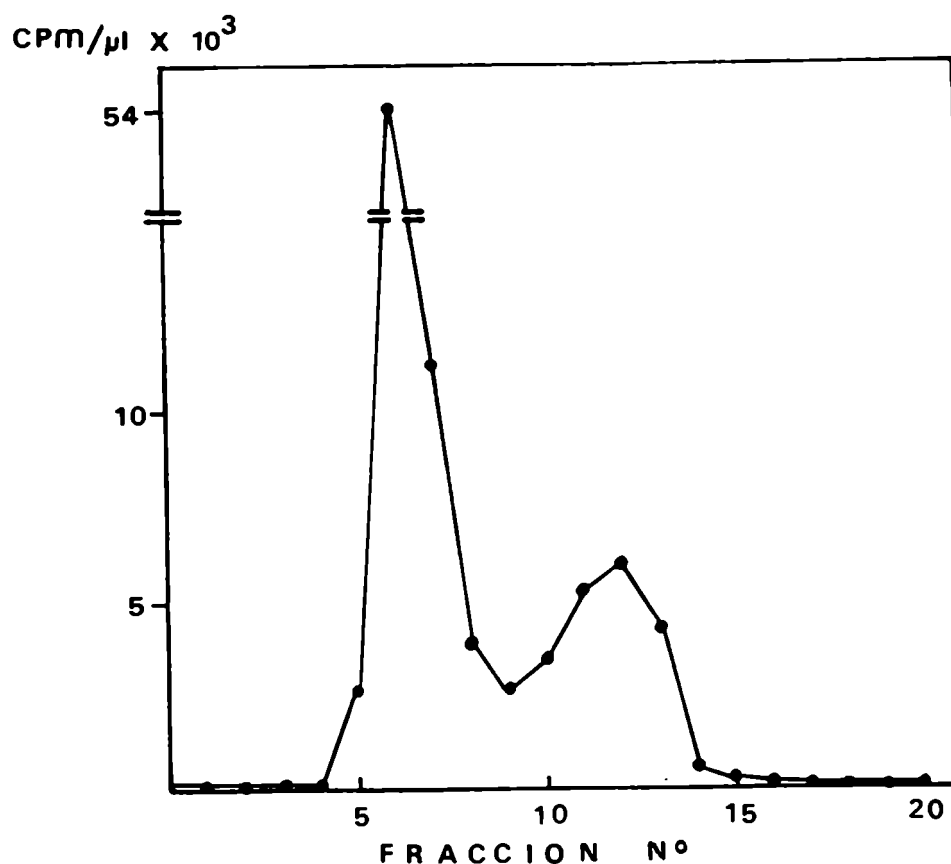


FIGURA 9: Perfil de elución en Sephadex G-25 correspondiente a la marcación de ADN total

Finalizada la incorporación, la radiactividad libre fue separada por cromatografía en columna de Sephadex G-25. La elución se llevó a cabo con agua bidestilada estéril, colectándose fracciones de 325 ul, y cuantificando las cpm presentes en alícuotas de 1 ul de cada una de ellas.

Las fracciones 5 a 9 fueron reunidas y concentradas por liofilización. La A.E. alcanzada fue de $4,9 \times 10^6$ cpm/ug ADN.

b) Secuencias invertidas: ADN neoplásico, cuya A_{260} fue estimada en 0,9 U., fue reasociado a valor $Cot = 4 \times 10^{-3}$

en presencia de PB 0,12 M ($\alpha = 1$), en un volumen final de 1,8 ml, siendo el tiempo requerido de 32 segundos. La reacción se detuvo por dilución y rápido pasaje por columna de HAP. Los segmentos reasociados fueron eluidos con PB 0,4 M (figura 10).

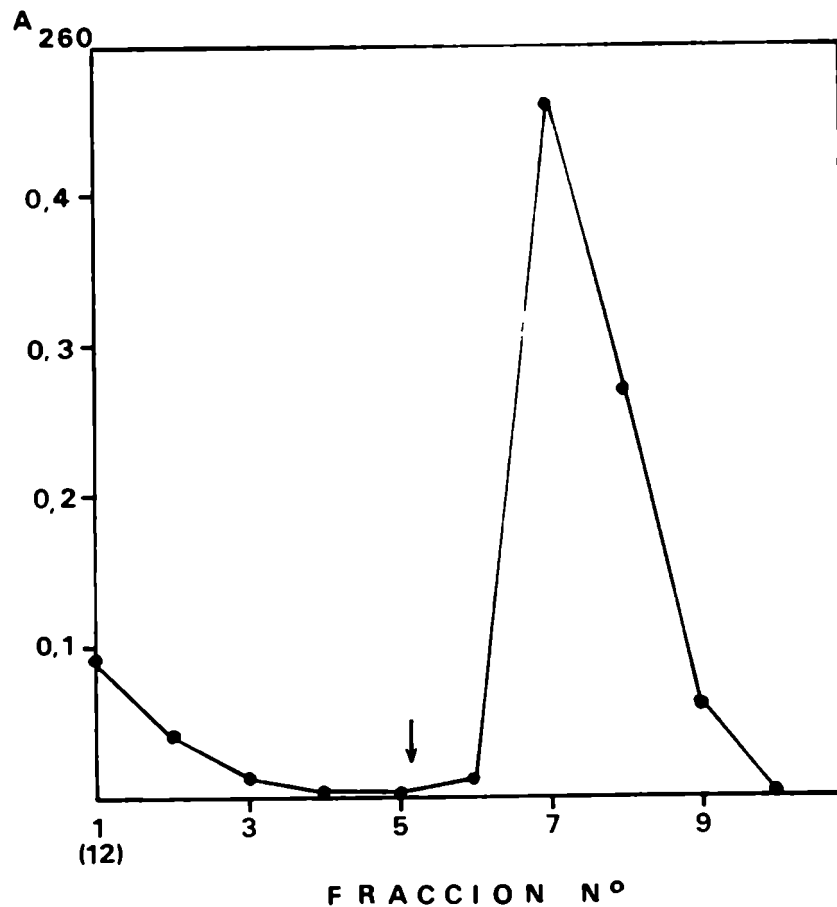


FIGURA 10: Perfil de elución obtenido por cromatografía en columna de HAP.

Finalizada la reasociación a $Cot = 4 \times 10^{-3}$, la muestra de ADN tumoral fue sembrada en una columna de HAP. El material percolado en PB 0,12M fue colectado en una primera fracción de 14 ml, mientras que los subsiguientes lavados, como asimismo el eluido con PB 0,4 M, fueron recogidos en fracciones de 1 ml. Se determinó la A_{260} en cada una de ellas.

La flecha indica el comienzo de la elución con PB 0,4 M.

La cantidad de ADN incubado fue de 80 ug aproximadamente, recuperándose como doble cadena mas del 40%. Este porcentaje resultó demasiado elevado en relación a lo esperado, lo cual quizás se debió nuevamente a que el pasaje de la muestra por la columna de HAP no fue lo suficientemente rápido. Dado que la cantidad en ug era pequeña, no se repitió el procedimiento: En estas condiciones, la sensibilidad del método de detección por A_{260} de las fracciones eluídas no sería adecuada. Por lo tanto, se decidió reasociar este material luego de ser marcado radioactivamente.

A este fin, las fracciones 7 y 8 eluídas de la columna (figura 10), fueron dializadas y concentradas por extracción con 2-butanol.

Una alícuota de 1,3ug fue incubada de acuerdo a lo expuesto en II.3.9., en un volumen final de 100 ul, en presencia de 100 uCi de dCTP- α ^{32}P A.E. 400 Ci/mmol.

Nuevamente se estudió la cinética de incorporación por cuantificación de las cpm ácido insolubles presentes en alícuotas tomadas de la mezcla de reacción, a intervalos de 30 minutos (figura 11).

La reacción se detuvo a los 160 minutos, separándose la radioactividad no incorporada por cromatografía en columna de Sephadex G-25. Se determinaron las cpm totales y TCA-precipitables presentes en cada fracción (figura 12).

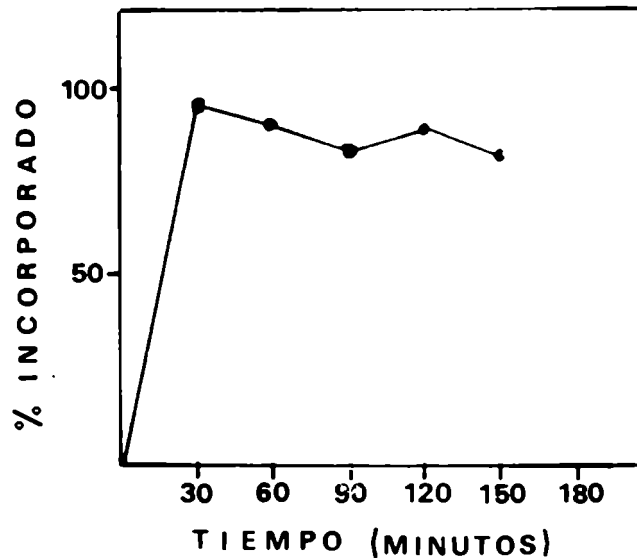


FIGURA 11: Cinética de incorporación de dCTP - $\alpha^{32}\text{P}$ a ADN de secuencias invertidas tumorales

1,3 ug de ADN tumoral reasociado a $\text{Cot} = 4 \times 10^{-3}$, cromatografiado en HAP, dializado y concentrado, fueron incubados en un volumen final de 100 ul, en presencia de 100 uCi de dCTP - $\alpha^{32}\text{P}$ bajo condiciones descritas en II.3.9. Cada 30 minutos, se tomó una alícuota de aproximadamente 0,5 ul, la cual fue diluída en 100 ul de EDTA 0,2 M. Se determinaron las cpm totales contenidas en 20 ul de la dilución. La radiactividad ácido insoluble fue cuantificada en 40 ul de la dilución, precipitadas previamente con 2 ml de TCA 10%, agregando 50 ug de ADN de salmón para coprecipitar. El material ácido precipitable fue retenido por filtración al vacío sobre filtros Millipore.

El porcentaje de incorporación se expresó como

$$\% = \frac{\text{cpm TCA-precipitables}}{\text{cpm totales} \times 2} \times 100$$

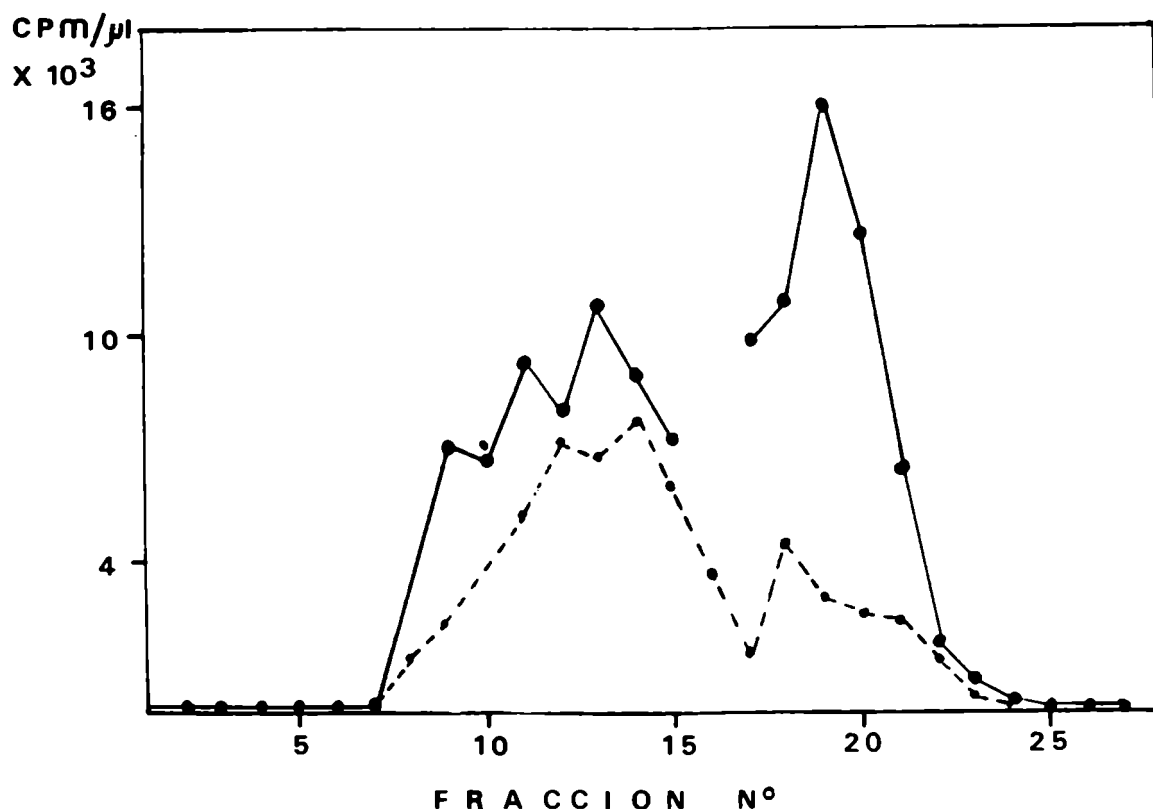


FIGURA 12: Perfil de elución en Sephadex G-25 correspondiente a la marcación de secuencias invertidas tumorales

Finalizada la incubación de incorporación, la radioactividad libre fue separada por cromatografía en columna de Sephadex G-25. La elución se llevó a cabo con agua bidestilada estéril, recogiendo fracciones de 180 μ l. La radioactividad presente en cada una de ellas fue estimada cuantificando las cpm totales y TCA 10%-precipitables, retenidas por filtración, en alícuotas correspondientes a 1 μ l.

—— cpm totales
- - - - cpm TCA-precipitables

La A.E. obtenida fue de 9×10^6 cpm/ μ g de ADN.

Si bien el perfil obtenido (figura 12) no resultó bien definido, se consideraron como cpm incorporadas, las fracciones 8 a 14, las cuales fueron reunidas y reasociadas

nuevamente a valor $ECot = 4 \times 10^{-3}$.

Se decidió detener la reacción de reasociación por digestión de ADN monocatenario con nucleasa S_1 . Como esta enzima hidroliza también ADN doble cadena cuando se halla en exceso, se determinaron las condiciones óptimas de digestión en forma experimental.

Por este motivo, y asimismo, para proteger al ADN-sonda de la acción de nucleasas inespecíficas contaminantes durante la incubación, se estudió la relación de ADN de salmón/U.E. S_1 a ser incluida para la digestión.

En primer término, se ensayó cuál era la cantidad de enzima tal que hidrolizara la menor cantidad de ADN-sonda doble cadena y la mayor de simple cadena. Para ello, se realizaron digestiones paralelas de aproximadamente 10.000 cpm de sonda, desnaturalizada previamente o no, en presencia de cantidad fija de ADN de salmón desnaturalizado (20 ug/ensayo) y cantidades crecientes de enzima. Las reacciones se incubaron en condiciones salinas ya descritas (II.3.6.4.) en un volumen de 500 ul, a 45°C durante una hora. Se determinó luego en cada caso, el porcentaje de radiactividad ácido insoluble remanente, obteniendo los resultados tabulados a continuación :

| MUESTRA DE ADN RADIOACTIVO | U.E. S ₁ | cpm TCA-insolubles | % PRECIPITACION |
|-------------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
| simple cadena | - - | 10.785 | 100 |
| simple cadena | 100 | 7.598 | 70 |
| simple cadena | 500 | 1.862 | 17 |
| simple cadena | 1.000 | 664 | 6 |
| simple cadena | 2.000 | 550 | 5 |
| doble cadena | - - | 10.657 | 100 |
| doble cadena | 100 | 8.419 | 78 |
| doble cadena | 500 | 4.269 | 40 |
| doble cadena | 1.000 | 3.527 | 33 |
| doble cadena | 2.000 | 3.325 | 31 |

TABLA VI: Digestión de ADN radiactivo en presencia de cantidades crecientes de enzima

Alícuotas de aproximadamente 10.000 cpm de ADN marcado con ³²P, previamente desnaturalizadas o no, fueron digeridas con cantidades crecientes de S₁. Las digestiones se realizaron en un volumen final de 500 ul, en presencia de 20 ug de ADN de salmón desnaturalizado, en condiciones salinas especificadas en II.3.6.4., durante 1 hora a 45°C. La reacción se detuvo enfriando a 0°C. El material resistente a la hidrólisis fue precipitado con 2 ml de TCA 10% - 150 ug de ADN de timo de ternera para coprecipitar, y retenido sobre membranas Millipore. El porcentaje de precipitación fue referido al obtenido por incubación en ausencia de enzima.

De acuerdo con estos datos, con 1.000 unidades de enzima se alcanzó un buen grado de hidrólisis de ADN monocatenario, el cual prácticamente se mantenía aún a concentración doble de enzima. Sin embargo, cerca de un 70% de ADN bicatenario también era digerido.

Se ensayó entonces si, en estas condiciones (10.000 cpm, 20 ug de ADN de salmón desnaturalizado, 1.000 unidades de enzima), la inclusión de ADN de salmón nativo era capaz de proteger al ADN sonda bicatenario, como así también una menor temperatura de incubación. Con este fin, se repitió el ensayo anterior en las condiciones mencionadas, durante 2 horas a 37°C, en presencia de cantidades crecientes de ADN de salmón nativo (Tabla VII).

| MUESTRA DE ADN RADIOACTIVO | U.E. S ₁ | ug ADN sal- món nativo | cpm TCA- insolubles | % PRECIPITACION |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------|
| simple cadena | -- | -- | 9.716 | 100 |
| simple cadena | 1000 | 1 | 1.525 | 16 |
| simple cadena | 1000 | 2 | 1.126 | 12 |
| simple cadena | 1000 | 4 | 1.125 | 12 |
| doble cadena | -- | -- | 8.804 | 100 |
| doble cadena | 1000 | 1 | 3.815 | 43 |
| doble cadena | 1000 | 2 | 3.959 | 45 |
| doble cadena | 1000 | 4 | 3.852 | 43 |

TABLA VII: Digestión de ADN radiactivo en presencia de cantidades crecientes de ADN de salmón nativo.

Alícuotas de aproximadamente 10.000 cpm de ADN radiactivo, previamente desnaturalizadas o no, fueron digeridas con 1000 U.E. de S_1 . Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 500 μ l, en presencia de 20 μ g de ADN de salmón desnaturalizado, y cantidades crecientes de ADN de salmón nativo, bajo condiciones salinas ya enunciadas, durante 2 horas a 37°C.

Las digestiones se detuvieron por enfriamiento a 0°C. El material ácido insoluble fue cuantificado como se indicó en la Tabla VI, calculándose el porcentaje de precipitación obtenido en cada caso.

Se concluyó que las condiciones óptimas serían aquellas correspondientes a 1.000 unidades de enzima, 20 μ g de ADN de salmón desnaturalizado y 1 μ g de ADN de salmón nativo a 37°C durante 2 horas.

Se procedió entonces a reasociar el ADN sonda a $ECot = 4 \times 10^{-3}$, en presencia de NaCl 0,2 M. Ello obedeció a que el ión fosfato inhibe la actividad de la enzima S_1 . La cantidad de ADN a emplear se estimó en 0,9 μ g, el cual se hallaba disuelto en aproximadamente 2,5 ml (volumen de las fracciones 8 a 14 eluídas en Sephadex G-25). Se lo desnaturalizó por calentamiento, y reasoció en un volumen final de 2,6 ml durante 43 minutos ($\alpha \approx 1,22$). La reacción se detuvo por enfriamiento y agregado de nucleasa S_1 , en las condiciones descriptas, para un volumen de 3 ml.

Se determinó que la radiactividad TCA-insoluble remanente en una alícuota de 1 μ l resultó del 80%.

El digerido fue cromatografiado en columna de HAP, en condiciones habituales, monitoreando la elución por cuan-

tificación de radiactividad presente en alícuotas de las fracciones obtenidas. Sin embargo, los resultados indicaron que toda la radiactividad fue percolada con PB 0,12 M, lo cual se debió probablemente a interferencia de algún componente de la mezcla de incubación con S₁, con la capacidad de unión de la HAP. Se reunieron entonces todas las fracciones del percolado presentando radiactividad, las cuales fueron dializadas.

IIIA.2.1.4. Hibridación molecular de ADN en fase sólida

a) Hibridación con sonda de ADN tumoral total-³²P

Los fragmentos de restricción obtenidos por digestión con Eco RI ó Hae III transferidos a filtros de nitrocelulosa, fueron hibridados con la sonda correspondiente a ADN tumoral total. La reacción se llevó a cabo en presencia de dextrán-sulfato 10% y 80 ug de ADN normal homólogo no radiactivo, cortado y desnaturalizado (II.3.11). La prehibridación e hibridación propiamente dicha se incubaron durante 23 y 24 horas respectivamente, a 42°C. Finalizada esta última, el filtro fue lavado y sometido a autorradiografía durante 4 días a temperatura ambiente.

Las imágenes autorradiográficas se reproducen en la figura 13.



FIGURA 13: Hibridación molecular de fragmentos de restricción de ADN normal y tumoral con ADN-sonda total

Alícuotas de 12 ug de ADN normal o tumoral fueron digeridas con Eco RI ó Hae III durante 1 hora a 37 °C en condiciones apropiadas (II.3.3.2). Los fragmentos de restricción fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 1,6%, transferidos a filtros de nitrocelulosa e hibridados con sonda de ADN tumoral total (A.E.= $4,9 \times 10^6$ cpm/ug ADN) en presencia de dextrán-sulfato 10% y 80 ug de ADN normal homólogo no radiactivo, cortado y desnaturalizado. Los híbridos se detectaron por autorradiografía (4 días a temperatura ambiente)

Carril 1: ADN tumoral digerido con Hae III
Carril 2: ADN normal digerido con Hae III
Carril 3: ADN tumoral digerido con Eco RI
Carril 4: ADN normal digerido con Eco RI

En los carriles 4 y 3, correspondientes a digeridos de Eco RI de ADN normal y tumoral respectivamente, se observan diferencias cuantitativas en el rango de segmentos de muy alto peso molecular (el tamaño exacto de los mismos no puede aseverarse, ya que el carril correspondiente al marcador no fue correctamente resuelto en la electroforesis).

En la zona de fragmentos de tamaño intermedio, se visualiza una mayor intensidad radiactiva en ADN normal, no presente en el caso de ADN neoplásico.

Entre los productos de digestión con Hae III -carriles 1 y 2- es remarcable la similitud del patrón obtenido para ambos ADNs, pero resulta obvia una mayor intensidad en la zona de muy elevado peso molecular del carril normal, ocurriendo el caso inverso en la región de tamaño medianamente alto e intermedio.

b) Hibridación molecular con sonda de secuencias invertidas tumorales - ^{32}P

Luego de realizada la primer autorradiografía, la sonda radiactiva fue eliminada como se describiera en Métodos (II.3.11.) El filtro fue luego preincubado 3,5 horas, e hibridado con ADN-sonda de secuencias invertidas tumora-

rales durante 23 horas, en presencia de dextrán-sulfato 10% y 100 ug de ADN normal homólogo no radiactivo, cortado y desnaturalizado, en condiciones idénticas a las anteriores. Una vez lavado, fue expuesto a autorradiografía durante 19 días a temperatura ambiente. La figura 14 ilustra los resultados obtenidos.



FIGURA 14: Hibridación molecular de fragmentos de restricción de ADN normal y tumoral con ADN-sonda de secuencias invertidas

Se reutilizó el filtro de nitrocelulosa al cual fueron transferidos los fragmentos de restricción, empleado en la figura anterior. La primera sonda fue eliminada por lavado del filtro en Tris-HCl 5 mM pH 8 - EDTA 2 mM - pirofosfato de Na 0,05% - solución Denhart x 0,1 , durante 2 horas a 65°C, repitiendo la operación dos veces. Luego se procedió a a preincubar e hibridar el filtro en condiciones habituales, con ADN - sonda de secuencias invertidas tumorales (A.E. = 9×10^6 cpm/ug ADN) , en presencia de dextrán-sulfato 10% y 100 ug de ADN normal homólogo no radiactivo, cortado mecánicamente y desnaturalizado, por 23 horas. Una vez lavada la radiactividad no unida, el filtro fue secado y expuesto a placa autorradiográfica durante 19 días a temperatura ambiente.

Carril 1:ADN tumoral digerido con Hae III

Carril 2:ADN normal digerido con Hae III

Carril 3:ADN tumoral digerido con Eco RI

Carril 4:ADN normal digerido con Eco RI

Nuevamente se revela un comportamiento diferencial de hibridación de la sonda con ADN normal y tumoral, distinto a su vez, al obtenido con la sonda anterior.

En relación a los digeridos de Eco RI (carriles 3 y 4), existe mayor radiactividad en el carril perteneciente a ADN normal, localizada principalmente en la región de peso molecular intermedio. Esto no ocurre en el carril 3, de ADN neoplásico.

Los ADNs digeridos con Hae III señalan también notables diferencias entre carriles correspondientes a segmentos de restricción normales y tumorales. Entre estos últimos, se observa una mayor hibridación de fragmentos intermedios y pequeños, con respecto a su contraparte normal.

IIIA.2.2. Segunda serie de ensayos

Se realizó básicamente sobre el esquema de la anterior serie de ensayos, de acuerdo al siguiente diseño experimental:

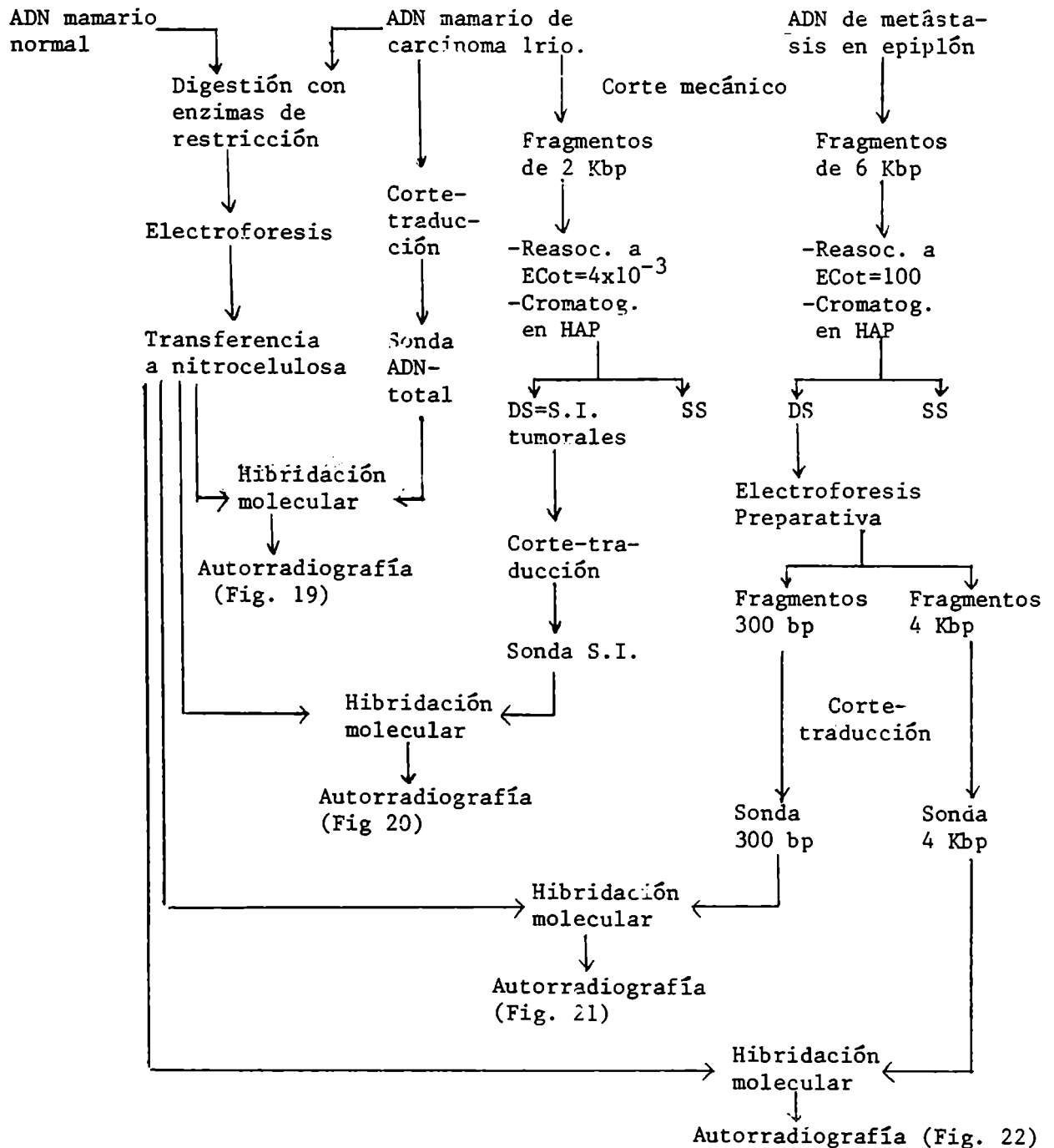


FIGURA 15: Esquema de trabajo

Las diferencias con respecto a la anterior serie de ensayos residen en que se transfirieron a nitrocelulosa los patrones de restricción obtenidos por digestión con 6 endonucleasas, sin previo fraccionamiento mecánico. Por otra parte, se emplearon 4 ADN-sonda. Aquéllos correspondientes a secuencias totales e invertidas fueron homólogos. Otras dos sondas utilizadas fueron de origen heterólogo, es decir provenían de una paciente diferente de aquélla cuyas biopsias fueron empleadas para obtener ADN restringido por endonucleasas: De una metástasis en epiplón de carcinoma mamario, se purificó ADN para ser reasociado a ECot = 100, seleccionando entre los segmentos reasociados a los que se encontraban en forma mayoritaria. Estos presentaron un tamaño de 300 y 4.000 bp.

IIIA.2.2.1. Purificación de ADN

El ADN normal y los dos ADNs neoplásicos utilizados en el presente estudio, se purificaron a partir de núcleos, según el procedimiento indicado en II.3.2.2.

IIIA.2.2.2. Obtención de fragmentos de restricción normales y tumorales - Transferencia a filtros de nitrocelulosa.

ADNs normal y carcinosomatoso purificados de un par de biopsias mamarias de la misma paciente, fueron digeridos en idénticas condiciones: Alícuotas correspondientes a 54 ug de cada muestra fueron incubadas con las siguientes endonu-

cleasas alternativamente: Eco RI - Hae III - Hind III - Sma I - Pst I - Xba I.

Las condiciones salinas utilizadas en cada caso se detallaron en Métodos (II.3.3.2.).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 60 ul, en presencia de 0,2 U.E./ug ADN durante 16 horas a 37°C (aproximadamente 2,5 veces en exceso con respecto a lo recomendado por los proveedores para digerir totalmente ADN de fago lambda o plásmido pBR322).

Alícuotas de 7 ug de cada digerido fueron resueltas por electroforesis en geles de agarosa 1,3%, repitiéndose esta operación por cuadruplicado. Finalizada la corrida electroforética, los fragmentos contenidos en cada gel fueron transferidos a sendos filtros de nitrato de celulosa, durante 36 horas como mínimo (II.3.7.)

IIIA.2.2.3. Obtención de ADN-sondas neoplásicos

ADN purificado del carcinoma primario mencionado en el punto anterior, como así también de metástasis en epiplón de diferente paciente, fueron cortados mecánicamente como se indicó en Métodos (II.3.3.1.) hasta 2 y 6 Kbp respectivamente.

Aproximadamente 450 ug del primero se reasociaron en sucesivas alícuotas a $Cot = 4 \times 10^{-3}$ en PB 0,12 M ($\phi = 1$) a 60°C, durante 10 segundos. Las secuencias invertidas resultantes fueron purificadas por cromatografía en columna de HAP, obteniéndose el siguiente perfil de elución:

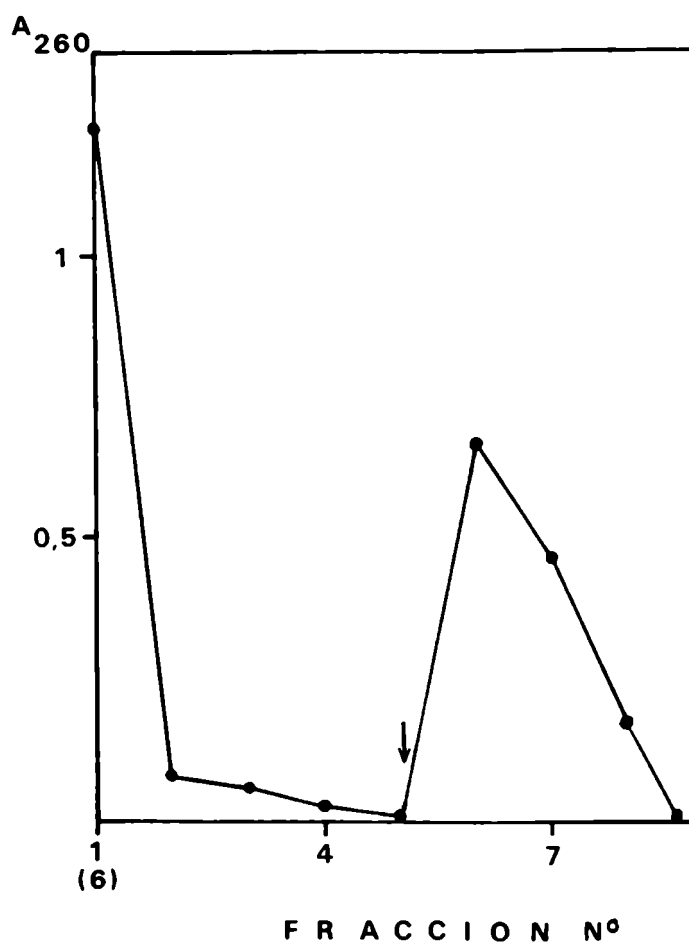


FIGURA 16: Perfil de elución de HAP correspondiente a secuencias invertidas de ADN de carcinoma primario

450 ug de ADN purificado de carcinoma primario, cortados mecánicamente hasta segmentos de 2 Kbp, se reasociaron a $Cot = 4 \times 10^{-3}$. Los segmentos doble cadena fueron cromatografiados en columna de HAP. El material percolado con PB 0,12 M fue recogido en una primera fracción de 6 ml, y los sucesivos lavados con igual fuerza iónica, en fracciones de 0,8 ml hasta obtener A_{260} nula. La elución de ADN doble - catenario se realizó con PB 0,4 M, el cual fue recolectado en fracciones de 0,8 ml.

La flecha indica el comienzo de la elución.

El ADN correspondiente a secuencias invertidas fue estimado en 55 ug (12% aproximadamente). Las fracciones 6 a 8 fueron reunidas, dializadas y digeridas con nucleasa S_1 en condiciones habituales (II.3.6.4.).

Por otra parte, ADN purificado a partir de metástasis en epiplón, (cortado mecanicamente hasta segmentos de 6 Kbp) fue reasociado a valor ECot = 100. La incubación se realizó en NaCl 0,18 M ($\delta = 1$) a 60°C durante 3,2 horas ($A_{260} = 62,5$). Una vez finalizada, se diluyó la muestra, digiriendo los segmentos no reasociados con nucleasa S_1 . El ADN doblecate-nario se purificó por cromatografía en columna de HAP. El perfil de elución obtenido se muestra en la figura 17.

La fracción reasociada se estimó aproximadamente en 2 mg, correspondiendo al 15% del total. Este valor fue inferior al esperado. Sin embargo, teniendo en cuenta que la recuperación total de la cromatografía resultó ser sólo del 60% (probablemente debido a interferencia de compuestos presentes en la incubación con S_1), se consideró aceptable el porcentaje reasociado.

Las fracciones eluídas con PB 0,4 M que presentaron A_{260} , fueron reunidas, dializadas y precipitadas dos veces con etanol. Finalmente se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM pH 8,2 - EDTA 5 mM - glicerol 10%.

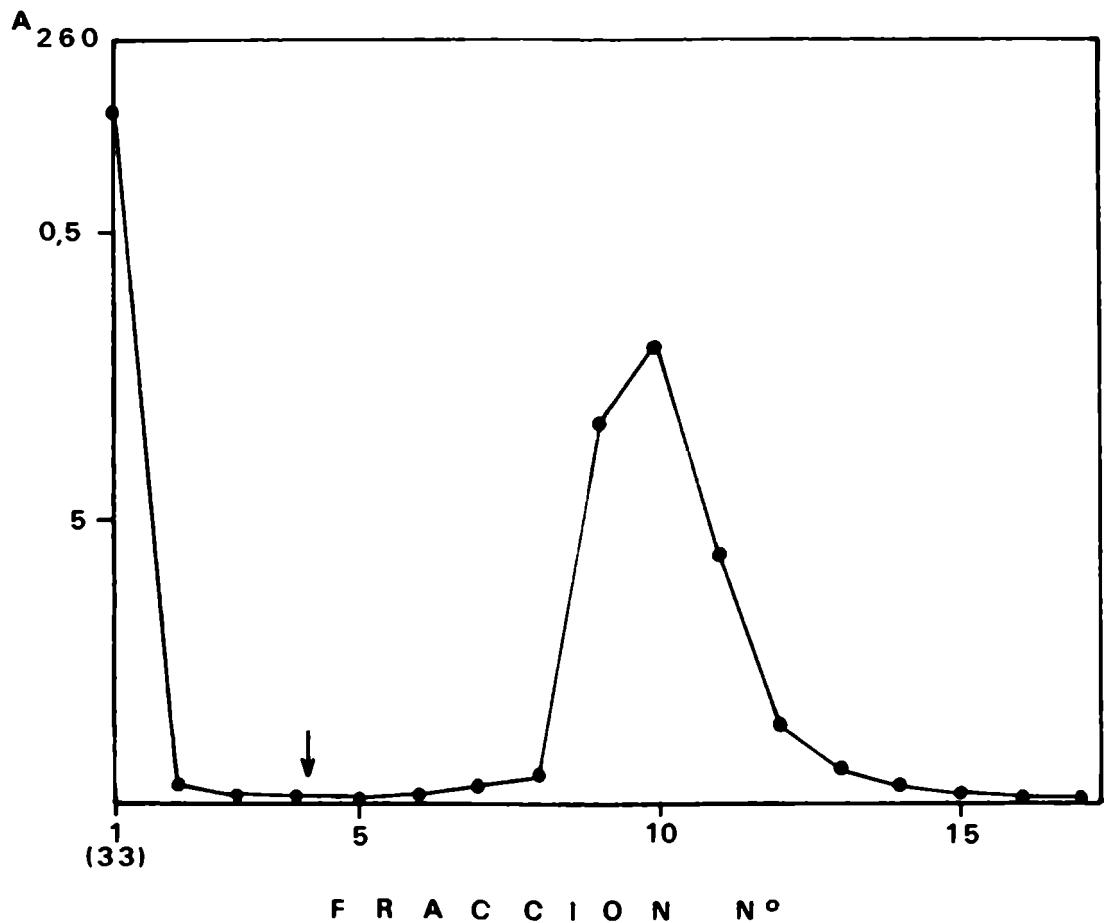


FIGURA 17: Perfil de elución en columna de HAP de secuencias repetitivas de ADN purificado de metástasis en epiplón.

Aproximadamente 15 mg de ADN purificado de metástasis en epiplón fueron reasociados a $ECot = 100$ y digeridos con nucleasa S_1 . Los segmentos doble cadena fueron purificados por cromatografía en columna de HAP. El material percolado con PB 0,12 M fue colectado en una primera fracción de 33 ml, y los sucesivos lavados con la misma fuerza iónica en fracciones de 4 ml, hasta obtener A_{260} despreciable. El ADN doblecatenario se eluyó con PB 0,4 M, recogién dose en fracciones de 4 ml.

La flecha indica el comienzo de la elución.

Se estudió la distribución de tamaño de una alícuota de los fragmentos reasociados, por electroforesis en gel de agarosa 3%. La imagen obtenida por tinción de dicho gel con bromuro de etidio, mostró la existencia de dos bandas mayoritarias, correspondientes a segmentos de 4.000 y 300 bp. De acuerdo a estos resultados, se practicó una electroforesis preparativa en condiciones idénticas a las anteriores. Los fragmentos de 4.000 y 300 bp se eluyeron del gel como se indicara en II.3.5.

0,1 ug de ADN total y secuencias invertidas del carcinoma primario, como también de las fracciones de 4.000 y 300 bp repetitivas de ADN metastásico, fueron marcados por el método de corte-traducción (II.3.9.). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 10 ul, en presencia de 85 uCi de dCTP- α 32 P A.E. 4.200 Ci/mmol, durante 1 hora.

La radiactividad no incorporada fue eliminada por cromatografía en columna de Sephadex G-50. Los perfiles de elución obtenidos se ilustran en la figura 18.

Los porcentajes de incorporación fueron de 46%, 56%, 33% y 32%, mientras que las actividades específicas alcanzaron valores de $3,4 \times 10^8$ cpm/ug ADN, $5,5 \times 10^7$ cpm/ug ADN, $2,4 \times 10^8$ cpm/ug ADN y $2,45 \times 10^8$ cpm/ug ADN para secuencias totales, invertidas, repetitivas de 4.000 bp y repetitivas de 300 bp respectivamente.

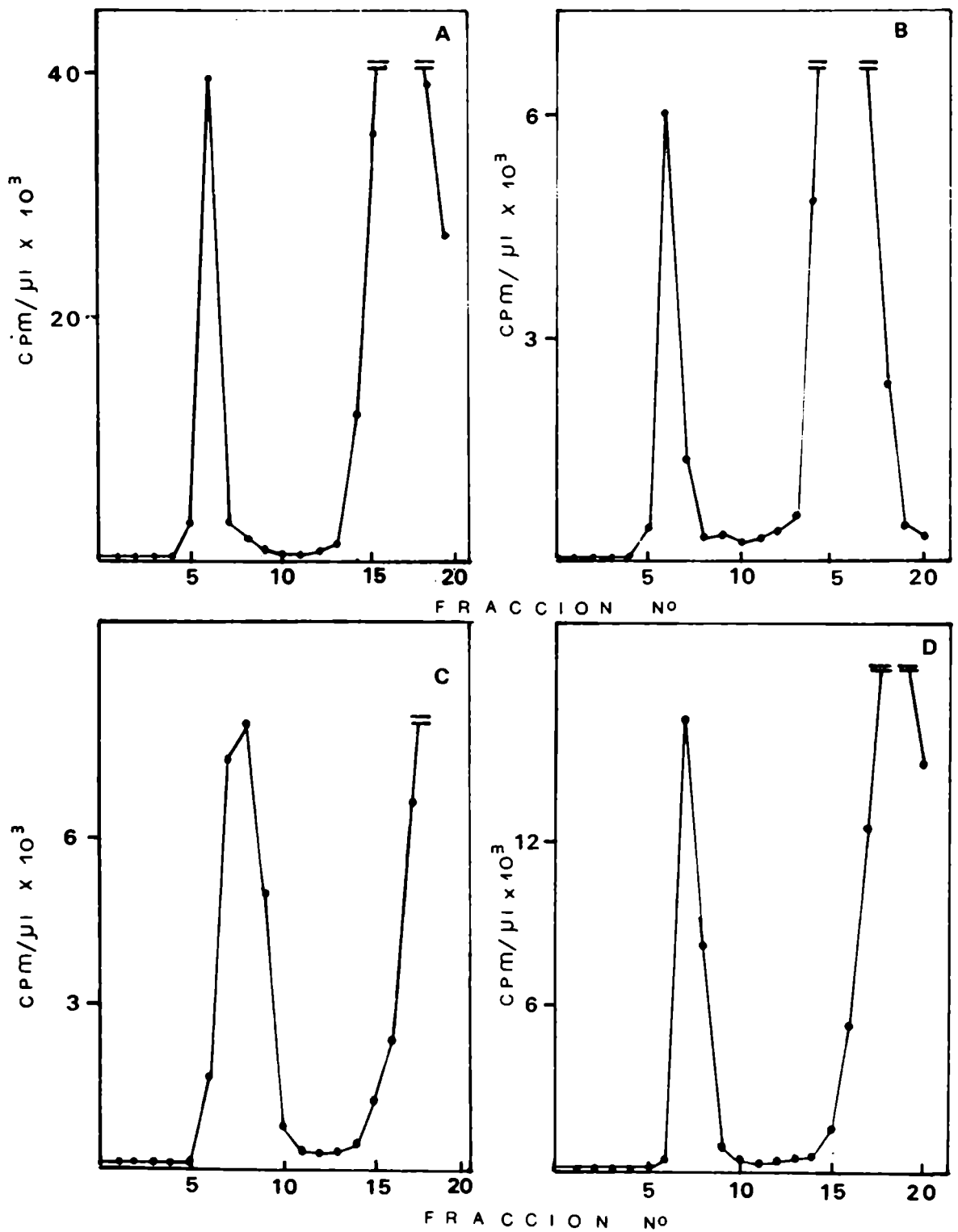


FIGURA 18: Perfil de elución en Sephadex G-50 de secuencias
totales, invertidas, repetitivas de 4000 bp y 300 bp.

0,1 ug de ADN total y de secuencias invertidas purificados de carcinoma primario homólogo, y de secuencias repetitivas de 4000 y 300 bp purificados de metástasis en epiplón heteróloga, fueron marcados radiactivamente como se describió en II.3.9. El volumen final de incubación fue de 10 ul en todos los casos, conteniendo 85 uCi de dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$ (A.E. = 4.200 Ci/mmol). Luego de 1 hora aproximadamente, la reacción se detuvo por agregado de EDTA 0,2 M y un vol. de IAC. Para eliminar la radiactividad no incorporada, la fase acuosa fue sembrada sobre columna de Sephadex G-50. La elución se llevó a cabo con agua bidestilada estéril, colectándose fracciones de 1 ml. La radiactividad presente en cada una fue determinada por cuantificación de las cpm correspondientes a alícuotas de 1 ul.

Panel A: ADN total

Panel B: Secuencias Invertidas

Panel C: Secuencias repetitivas de 4000 bp

Panel D: Secuencias repetitivas de 300 bp.

IIIA.2.2.4. Hibridación molecular de ADN en fase sólida

Los ADN-sonda fueron hibridados con fragmentos de restricción transferidos a filtros de nitrocelulosa como se describiera en IIIA.2.2.2.

Las prehibridaciones se llevaron a cabo durante 2 horas aproximadamente, y las hibridaciones propiamente dichas durante 18 horas. En este caso se realizaron en ausencia de dextrán-sulfato, incluyendo 35 ug de ADN normal no radiactivo, previamente cortado y desnaturalizado.

Los híbridos formados fueron expuestos a placas autorradiográficas durante 10 días, en presencia de pantallas intensificadoras.

A continuación se reproducen las imágenes resultantes:

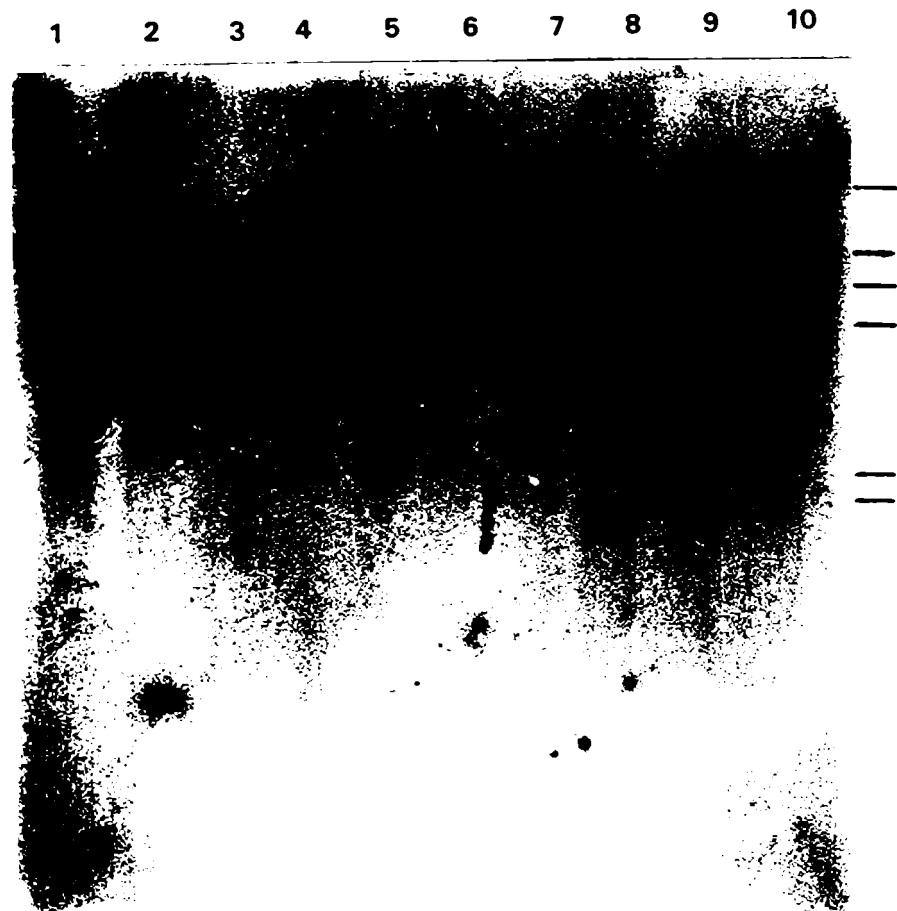


FIGURA 19: Hibridación de ADN-sonda tumoral total homólogo con fragmentos de restricción de ADN normal y tumoral

ADNs purificados de tejido mamario tumoral y normal fueron digeridos alternativamente con Hind III, Eco RI, Sma I, Pst I y Xba I (0,2 U.E./ug ADN durante 16 horas en condiciones descritas en II.3.2.2.)

7 ug de cada digerido fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 1,3%, y transferidos a filtros de nitrocelulosa. Los fragmentos de restricción fueron hibridados con ADN tumoral total homólogo marcado con ^{32}P (A.E. = $3,4 \times 10^8$ cpm/ug ADN), en ausencia de dextrán-sulfato, incluyendo 35 ug de ADN normal no radiactivo, cortado y desnaturalizado.

Los híbridos fueron detectados por autorradiografía en presencia de pantalla intensificadora, durante 10 días.

Carriles 1 y 2: Digeridos con Hind III

Carriles 3 y 4: Digeridos con Eco RI

Carriles 5 y 6: Digeridos con Sma I

Carriles 7 y 8: Digeridos con Pst I

Carriles 9 y 10: Digeridos con Xba I

Los carriles impares corresponden a fragmentos de ADN proveniente de tejido peritumoral normal, y los carriles pares, a fragmentos de ADN proveniente de tejido carcinomatoso.

A la derecha de la figura se indica la posición de segmentos utilizados como marcadores de tamaño molecular (ADN de fago lambda digerido con Hind III) de 23 - 9,46 - 6,61 - 4,26 - 2,26 y 1,98 Kbp, de arriba hacia abajo respectivamente.

Existen marcadas diferencias en la distribución del ADN-sonda, comparando los carriles correspondientes a ADN neoplásicos en relación con su contraparte normal.

En los digeridos de la enzima Hind III, existe mayor reasociación con ADN normal en la zona de alto peso molecular (carril 1).

Cuando los ADN son digeridos con Eco RI, la mayor densidad de la marca corresponde a la región de mediano y alto tamaño molecular del carril tumoral (4) en comparación con el carril normal (3). En la zona de fragmentos pequeños ocurre lo inverso, aunque se evidencia con menor intensidad.

Existe una mayor afinidad del ADN-sonda en la zona de muy elevado peso molecular, en los digeridos normales de Sma I, Pst I y Xba I (carriles 5, 7 y 9) en comparación con los neoplásicos (carriles 6, 8 y 10), siendo este fenómeno más notorio para la primer enzima mencionada.

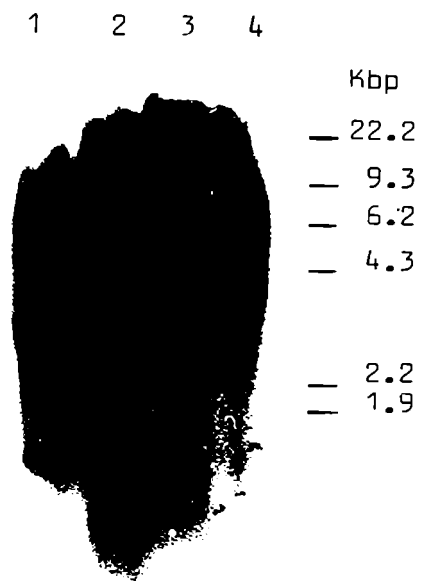


FIGURA 20: Hibridación de ADN-sonda de secuencias invertidas tumorales homólogas con fragmentos de restricción de ADN normal y tumoral

ADNs purificados de tejido mamario tumoral y normal fueron digeridos alternativamente con las endonucleasas Eco RI o Sma I (0,2 U.E./mg ADN durante 16 horas según se señaló en II.3.2.2)

7 ug de cada digerido fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 1,3% y transferidos a filtro de nitrocelulosa.

Los fragmentos de restricción fueron hibridados con secuencias invertidas tumorales homólogas marcadas con ^{32}P (A.E. = $5,5 \times 10^7$ cpm/ug ADN) en ausencia de dextrán-sulfato, incluyendo 35 ug aproximadamente de ADN normal no radiactivo, cortado y desnaturalizado.

Los híbridos fueron detectados por autorradiografía en presencia de pantalla intensificadora durante 10 días.

Carriles 1 y 2: Digeridos con Eco RI

Carriles 3 y 4: Digeridos con Sma I

Los carriles impares corresponden a fragmentos de ADN provenientes de tejido normal, y los carriles pares, a fragmentos de ADN purificado de tejido normal.

A la derecha de la figura se indica la posición de los segmentos marcadores de tamaño molecular (ADN de fago lambda digerido con Hind III) de 23 - 9,46 - 6,61 - 4,26 - 2,26 y 1,98 Kbp, de arriba hacia abajo respectivamente.

Se destaca un discreto incremento en la retención específica del ADN-sonda por parte de fragmentos de ADN neoplásico, comprendidos entre 20 y 4 Kbp aproximadamente, respecto de su contraparte normal, en los digeridos de ambas enzimas.

Es remarcable la presencia de una banda mayoritaria de elevado peso molecular, en el carril 3, correspondiente a ADN normal digerido con Sma I, en forma similar a lo observado en la figura anterior.



FIGURA 21: Hibridación de ADN-sonda de secuencias repetitivas tumorales heterólogas de 300 bp, con fragmentos de restricción de ADN normal y tumoral.

ADN obtenido de metástasis humana en epiplón de carcinoma mamario, fue reasociado a ECot = 100. Los segmentos reasociados de 300 bp de longitud fueron purificados por electroforesis preparativa en agarosa 3%, y marcados con ^{32}P por el método de corte-traducción (A.E. = $2,4 \times 10^8$ cpm/ug ADN). Dichos segmentos se hibridaron con ADNs purificados de un par de biopsias mamarias humanas, normal y carcinomatosa, los cuales fueron digeridos por enzimas de restricción y transferidos a nitrocelulosa, como se indicó en la figura 19.

Carriles 1 y 2: ADNs digeridos con Hae III

Carriles 3 y 4: ADNs digeridos con Hind III

Carriles 5 y 6: ADNs digeridos con Eco RI

Carriles 7 y 8: ADNs digeridos con Sma I

Carriles 9 y 10: ADNs digeridos con Pst I

Carriles 11 y 12: ADNs digeridos con Xba I

Los carriles pares corresponden a fragmentos provenientes de tejido normal, y los carriles impares a fragmentos purificados de carcinoma primario.

A la derecha de la figura se indica la posición de segmentos marcadores de tamaño molecular (ADN de fago lambda digerido con Hind III) de 23 - 9,46 - 6,61 - 4,26 - 2,26 y 1,98 Kbp, de arriba hacia abajo respectivamente.

En este caso, no se visualizan mayores diferencias en el patrón de distribución del ADN-sonda heterólogo al comparar los carriles correspondientes a ADN normal y tumoral, aún en la zona de elevado peso molecular del digerido normal de Sma I (carril 8)

Puede observarse únicamente una marcada ausencia de material hibridable, comprendida entre 700 y 900 bp, en el carril correspondiente a ADN tumoral digerido con Hae III (carril 1), lo cual no ocurre en su contraparte normal (carril 2).

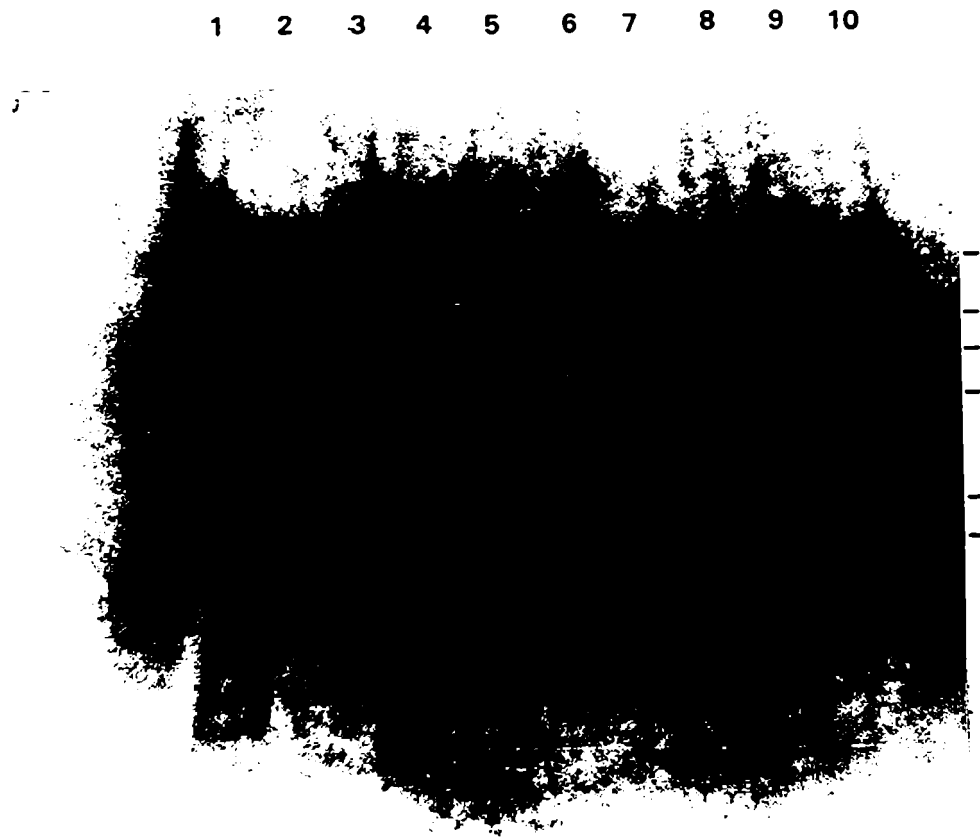


FIGURA 22: Hibridación de ADN-sonda de secuencias repetitivas tumorales heterólogas de 4000 bp, con fragmentos de restricción de ADN normal y tumoral.

ADN obtenido de metástasis en epiplón de carcinoma primario mamario, fue reasociado a ECot = 100. Los segmentos reasociados de 4000 bp de longitud se purificaron por electroforesis preparativa en gel de agarosa 3%, y marcaron con ^{32}P por el método de corte-traducción (A.E. = $2,4 \times 10^8$ cpm/ug ADN). Dichos segmentos se hibridaron con fragmentos de restricción de ADN normal y carcinomatoso proveniente de un par de biopsias homólogas, los cuales fueron previamente transferidos a nitrocelulosa como se indicó en la figura 19.

Carriles 1 y 2: ADNs digeridos con Xba I

Carriles 3 y 4: ADNs digeridos con Pst I

Carriles 5 y 6: ADNs digeridos con Sma I

Carriles 7 y 8: ADNs digeridos con Eco RI

Carriles 9 y 10: ADNs digeridos con Hind III

Los carriles impares corresponden a fragmentos provenientes tejido normal, mientras que los pares corresponden a fragmentos purificados de carcinoma mamario primario.

A la derecha de la figura se indica la posición de segmentos marcadores de tamaño molecular (ADN de fago lambda digerido con Hind III) de 23 - 9,46 - 6,61 - 4,26 - 2,26 y 1,98 Kbp, de arriba hacia abajo, respectivamente.

Nuevamente, las diferencias entre el comportamiento de hibridación de ADN normal y tumoral no son muy evidentes.

Cabe mencionar solamente, la presencia de menor intensidad en la banda correspondiente a 1,9 Kbp aproximadamente en el digerido normal de Hind III (carril 9), no aparente en el neoplásico (carril 10).

Por otra parte, la banda mayoritaria de alto peso molecular en el digerido normal de Sma I (carril 5) de las figuras 19 y 20 se halla notablemente disminuida.

III.B. ESTUDIO SOBRE METILACION DE CITOSINA EN ADNs PROVENIENTES DE CELULAS MAMARIAS HUMANAS NORMALES Y NEOPLASICAS

Los resultados obtenidos en las figuras 19 y 20, con respecto a los digeridos de Sma I, sugieren la posibilidad de una metilación disminuída en ADN tumoral. Esta suposición se basa en el hecho que la enzima no actúa cuando la citosina interna de su secuencia de reconocimiento y corte (C-C-C G-G-G) se halla metilada. Como ya se señalara, es justamente en el dinucleótido C-G el caso más frecuente de ocurrencia de metilación. Sin embargo, no se puede descartar que las diferencias encontradas se deban a un cambio en el ADN genómico incluído en dicha secuencia, y no a la modificación por metilación de una de sus bases, o a ambos fenómenos en forma simultánea.

Es así que se orientó el presente estudio, a la búsqueda de diferencias en la metilación de ADN de células neoplásicas mamarias humanas, en relación con las normales, ya sea a nivel del patrón de distribución de las citosinas metiladas, como en su contenido porcentual.

III.B.1. ESTUDIO SOBRE DIFERENCIAS EN LOS PATRONES DE DISTRIBUCION DE 5mC

En este caso, se analizaron los patrones de restricción obtenidos por digestión de ADNs mamarios humanos nor-

males y neoplásicos con las enzimas Hpa II y Msp I (II.1.)

Los fragmentos fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa. Estos fueron teñidos con bromuro de etidio, fotografiados y sus negativos sujetos a densitometría.

Alternativamente, los fragmentos de restricción fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa, hibridados con ADN-sonda tumoral y autorradiografiados, sometiendo la placa obtenida a densitometría.

En ambos casos, la comparación de los densitogramas permitió el estudio de los patrones de metilación de las muestras empleadas.

IIIB.1.1. Primera serie de ensayos

IIIB.1.1.1. Purificación de ADN

Se purificó ADN de un par de biopsias de carcinoma mamario humano y tejido peritumoral normal, provenientes de la misma paciente, como así también de la línea celular T47D, de acuerdo al método enunciado en II.3.2.2. La integridad del ADN fue monitoreada por electroforesis, mostrando ser mayor de 23 Kbp en todos los casos.

IIIB.1.1.2. Obtención de patrones de restricción

8 ug de cada ADN fueron digeridos en idénticas condiciones con Hpa II o Msp I. Las incubaciones se realizaron durante 20 horas en presencia de 1 U.E./ug ADN, y 20 horas

adicionales en presencia de 2 U.E./ug ADN, en concentraciones salinas indicadas en II.3.3.2.

Alícuotas de cada muestra tomadas a las 20 y 40 horas de incubación, analizadas por electroforesis en geles de agarosa 1%, mostraron idéntico grado de digestión, por lo cual se consideró que fue completa. Por otra parte, se descartó la presencia de inhibidores de la enzima, por la total digestión de ADN de fago lambda luego de incubarlo con alícuotas de la mezcla de reacción durante 2 horas a 37°C.

2,2 ug de cada ADN digerido fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 0,8% a 85 V durante 2,5 horas. El gel fue luego teñido con bromuro de etidio durante 15 minutos, desteñido durante igual período con agua bidestilada, y fotografiado bajo luz UV.

La imagen obtenida se ilustra en la figura 23.

IIIB.1.1.3. Análisis densitométrico de los patrones de restricción

Las diferencias entre los patrones de restricción obtenidos fueron estudiadas por análisis comparativo de sus perfiles densitométricos.

En la figura 24 puede observarse la comparación de los patrones de cada muestra digerida con Hpa II o Msp I.



FIGURA 23: Electroforesis de fragmentos de restricción de Hpa II y Msp I de ADNs provenientes de células mamarias humanas normales y neoplásicas.

2,2 ug de ADN de alto peso molecular (> 23 Kbp) de cada muestra fueron digeridos con 25 excesos de Hpa II o Msp I bajo condiciones apropiadas (II.3.2.2.) durante 40 horas. Los fragmentos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 0,8%, el cual fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV.

Carriles 1 y 4: ADN de tejido normal

Carriles 2 y 5: ADN de carcinoma

Carriles 3 y 6: ADN de T47D

Los carriles 1 a 3 corresponden a digeridos de Hpa II, y los carriles 4 a 6, a digeridos de Msp I.

Carril M: Fragmentos marcadores de tamaño molecular de 23 - 9,46 - 6,61 - 4,26 - 2,26 y 1,98 Kbp, de arriba hacia abajo respectivamente.

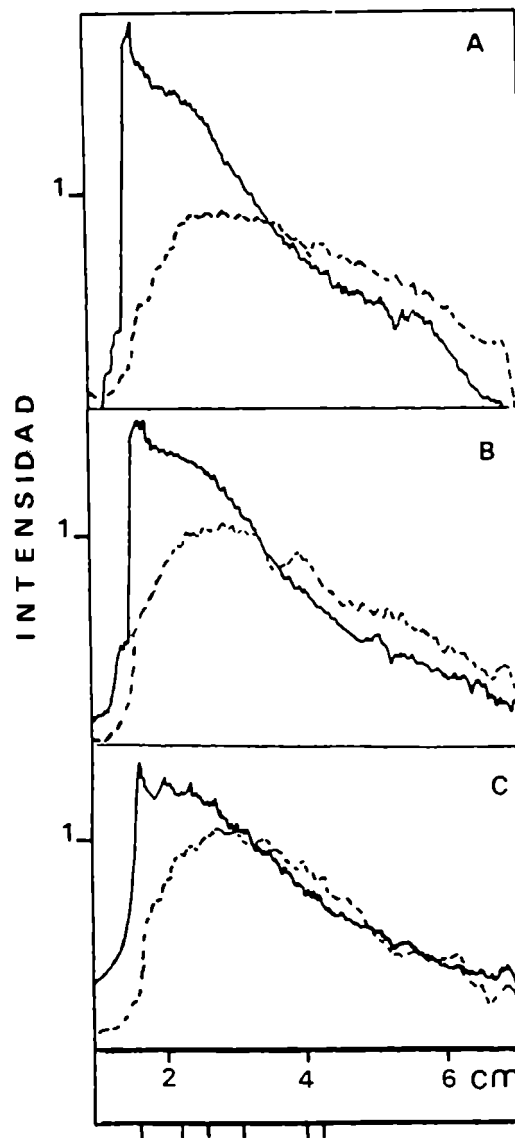


FIGURA 24: Análisis comparativo de los densitogramas correspondientes a digeridos de Hpa II Msp I de la figura 23.

Los negativos de cada carril de la figura 23 fueron analizados por densitometría a 590 nm.

Panel A : ADN de tejido normal

Panel B : ADN de carcinoma

Panel C : ADN de T47D

———— Digeridos de Hpa II

- - - - Digeridos de MspI

Las unidades de intensidad de absorbancia son arbitrarias.

La escala superior corresponde a la migración, expresada en cm.

La escala inferior indica la posición de los fragmentos marcadores de tamaño molecular empleados en la figura 23.

En los paneles A, B y C se visualiza un aumento de especies moleculares de elevado peso molecular de los trazados correspondientes a Hpa II (línea llena) en relación a los de Msp I (línea cortada). Lo inverso ocurre en la zona perteneciente a fragmentos menores de 4 Kbp aproximadamente.

Como ya se mencionara, las dos endonucleasas reconocen la misma secuencia y sitio de corte, pero Hpa II no es capaz de clivar si ésta se halla metilada en su citosina interna, mientras que Msp I no lo hace si la externa está metilada. Como la mayoría de 5mC ocurre en el dinucleótido C-G, se concluye que aquéllas especies de alto peso molecular aumentadas en los trazados de Hpa II, corresponden a segmentos conteniendo internamente la secuencia C-5mC-G-G. Concomitantemente, las especies de bajo peso molecular, incrementadas en los trazados de Msp I, corresponderían a los mismos segmentos, que han sido clivados por esta enzima hasta un tamaño menor.

Para determinar si los ADNs provenientes de tejido mamario normal y tumoral exhiben un patrón de metilación diferente, se compararon las gráficas densitométricas de sus digeridos con Hpa II y Msp I, como se indica en la figura 25 (paneles A y B respectivamente).

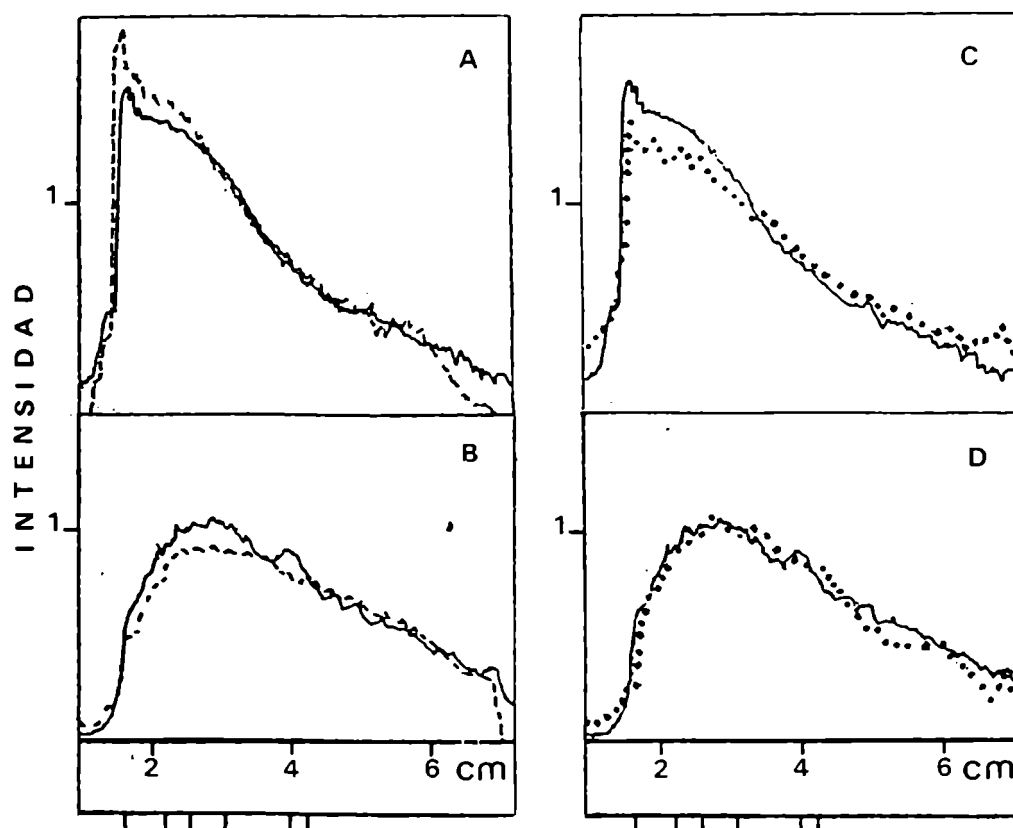


FIGURA 25: Análisis comparativo de los densitogramas correspondientes a digeridos normales, tumorales de la línea celular T47D de la figura 23

Los negativos correspondientes a cada carril de la figura 23 fueron analizados por densitometría a 590 nm

Panel A: ADNs normal y tumoral digeridos con Hpa II

Panel B: ADNs normal y tumoral digeridos con Msp I

Panel C: ADNs tumoral y de T47D digeridos con Hpa II

Panel D: ADNs tumoral y de T47D digeridos con Msp I

- - - ADN de tejido normal; — ADN de tejido tumoral;ADN de T47D

Las unidades de intensidad de absorbancia son arbitrarias.

La escala superior corresponde a la migración, expresada en cm.

La escala inferior indica la posición de los fragmentos marcadores de tamaño molecular empleados en la figura 23.

Se observa un aumento de la intensidad en la región de alto peso molecular, acompañado de una discreta disminución en la zona de tamaño menor en el trazado normal de Hpa II. Las especies presentes en el primer rango fueron identificadas como aquéllas conteniendo 5mC en su secuencia. Por lo tanto se puede inferir que se hallan presentes en mayor proporción en tejido normal que en carcinoma. En otras palabras, el tejido normal contendría ADN hipermetilado en relación al proveniente de carcinoma.

Se investigó a continuación si el patrón de metilación diferencial de ADN tumoral se encontraba también en la línea celular T47D, derivada de un carcinoma mamario humano.

La comparación de los perfiles de Hpa II de ADN de tejido tumoral y de la línea T47D indicaría que éste último se halla aún más hipometilado, puesto que su trazado es inferior en la zona correspondiente a fragmentos de elevado tamaño molecular (figura 25, panel C).

IIIB.1.2. Segunda serie de ensayos

IIIB.1.2.1. Purificación de ADN

En esta serie de ensayos se empleó otro par de biopsias mamarias humanas, tumoral y peritumoral de una misma paciente, y células T47D, purificando su ADN a partir de núcleos (II.3.2.2.).

Nuevamente, se verificó por electroforesis en gel de agarosa, que el material obtenido fuera de elevado peso molecular (> 23 Kbp), obteniendo resultados satisfactorios.

IIIB.1.2.2. Obtención de patrones de restricción - Transferencia a filtros de nitrocelulosa

7 ug de cada muestra de ADN fueron digeridos con Hpa II o Msp I, como se indicó en la anterior serie de ensayos. Realizando los controles mencionados en el mismo punto, se aseguró la ausencia de inhibidores enzimáticos y la completa digestión de los ADNs.

Finalizada la incubación, alícuotas correspondientes a 2,3 ug de cada ADN digerido fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0,8%, durante 4 horas a 80 V.

Los fragmentos resueltos fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa durante 36 horas.

IIIB.1.2.3. Obtención de ADN-sonda tumoral

ADN tumoral homólogo de alto peso molecular fue marcado con ^{32}P mediante el método de corte-traducción (II.3.9.) 0,26 ug se incubaron en un volumen final de 20 ul en presencia de 85 uCi de dGTP - α ^{32}P (A.E. = 2.500 Ci/mmol) durante 45 minutos.

La radiactividad libre fue eliminada por cromatografía en columna de Sephadex G-25, obteniéndose el siguiente perfil de elución:

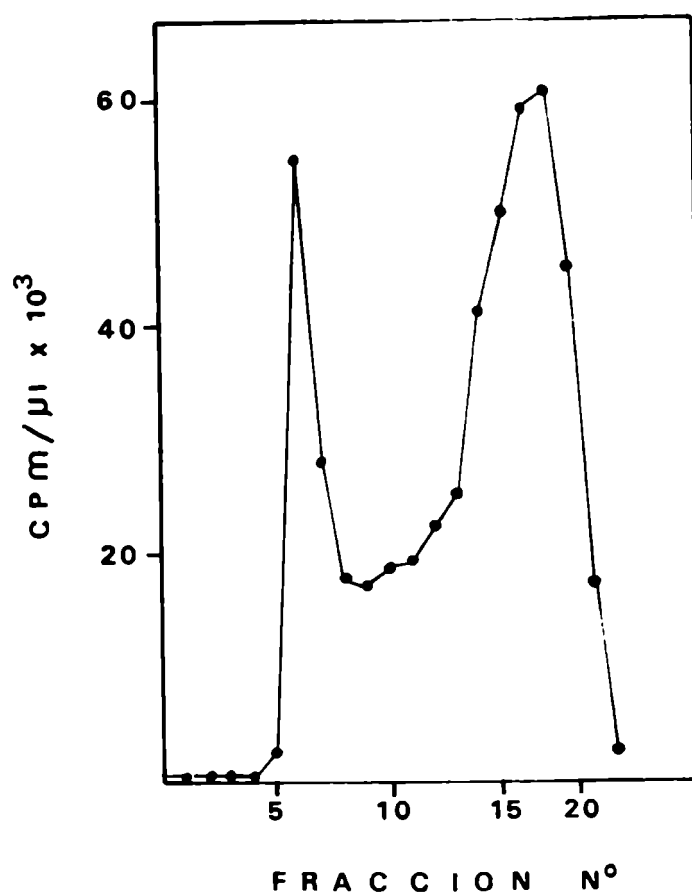


FIGURA 26: Perfil de elución en columna de Sephadex G-25

Finalizada la incubación de incorporación de dGTP- $\alpha^{32}\text{P}$ a ADN tumoral total, la radiactividad incorporada fue separada de la libre por cromatografía en columna de Sephadex G-25. La elución se llevó a cabo con agua bidestilada estéril, recogién dose fracciones de 0,5 ml. La radiactividad presente en cada una de ellas fue estimada por cuantificación de alícuotas correspondientes a 1 μl .

Las fracciones 5 a 9 fueron reunidas, estimándose la incorporación en 17%, y la actividad específica alcanzada en $2,3 \times 10^8$ cpm/ μg ADN.

IIIB.1.2.4. Detección de patrones de restricción transferidos a nitrocelulosa por hibridación con sonda de ADN tumoral

Los fragmentos de restricción obtenidos por digestión de ADNs normal y tumoral con Hpa II y Msp I fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa e hibridados con ADN-sonda tumoral.

La preincubación se realizó durante 2 horas, y la hibridación durante 40 horas, omitiendo la presencia de dextrán sulfato y de ADN normal frío.

Concluída la incubación, el filtro fue lavado para eliminar la radiactividad no unida específicamente, y expuesto a una placa autorradiográfica durante 10 horas en presencia de pantallas intensificadoras.

La figura 27 reproduce la imagen obtenida.

IIIB.1.2.5. Estudio comparativo de los patrones de restricción

La impresión autorradiográfica de cada digerido hibridado con el ADN-sonda tumoral fue sometido a densitometría a 590 nm. De esta manera se realizó el estudio comparativo de los resultados obtenidos en la figura 27.

En primer término, se compararon los trazados de los digeridos de Hpa II y Msp I, con el fin de identificar las especies moleculares conteniendo la mayor proporción de secuencias C-5mC-G-G, para cada muestra empleada (figura 28).



FIGURA 27: Hibridación de ADN-sonda tumoral con fragmentos de restricción de ADN purificados de células mamarias humanas normales y neoplásicas, digeridos con Hpa II o Msp I.

1,4 ug de ADN de alto peso molecular (> 23 Kbp) de cada muestra fueron digeridos con 25 excesos de Hpa II o Msp I bajo condiciones apropiadas (II.3.2.2.) durante 40 horas. Los fragmentos obtenidos fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 8%, transferidos a filtros de nitrocelulosa e hibridados con ADN-sonda tumoral durante 40 horas. Los híbridos se detectaron por autorradiografía en presencia de pantallas intensificadoras durante 10 horas.

Carriles 1 y 4: ADN normal; Carriles 2 y 5: ADN tumoral; Carriles 3 y 6: ADN de T47D. Los carriles 1 a 3 corresponden a digeridos con Hpa II, y los carriles 4 a 6, a digeridos con Msp I.

A la derecha, se indica la posición de los marcadores de tamaño molecular de 23 - 9,46 - 6,61 - 4,26 - 2,26 y 1,98 Kbp de arriba hacia abajo, respectivamente.

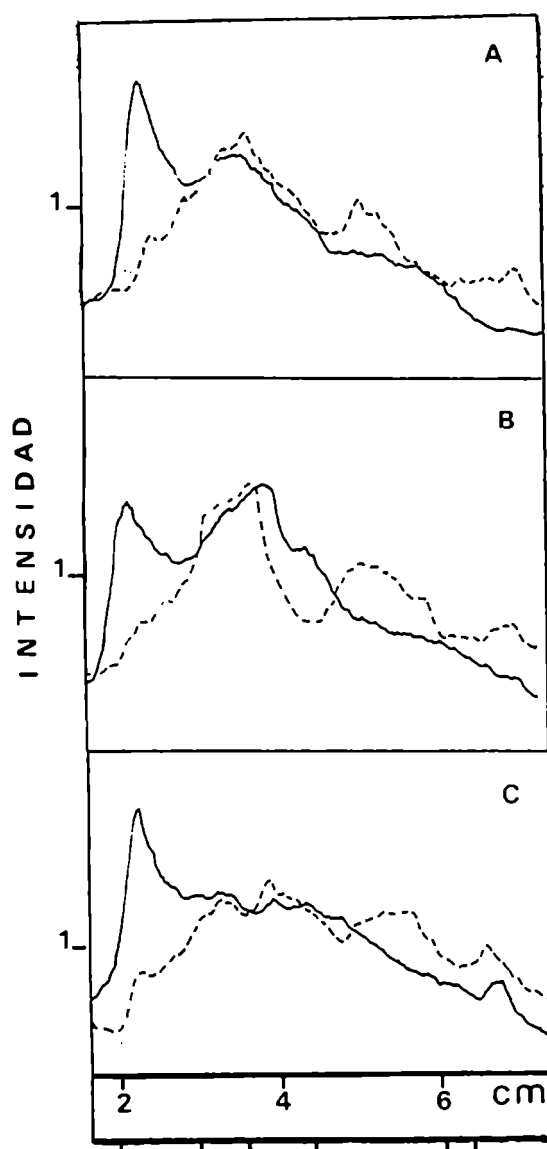


FIGURA 28: Análisis comparativo de los densitogramas correspondientes a digeridos de Hpa II y Msp I de la figura 27

Cada carril de la placa autorradiográfica de la figura 27 fue analizado por densitometría a 590 nm.

Panel A: ADN de tejido normal

Panel B: ADN de tejido tumoral

Panel C: ADN de T47D

———— Digeridos de Hpa II; - - - - Digeridos de Msp I

Las unidades de intensidad de absorbancia son arbitrarias.

La escala superior corresponde a la migración, expresada en cm.

La escala inferior indica la posición de los fragmentos marcadores de tamaño molecular empleados en la figura 27.

Como en la anterior serie de ensayos, el análisis de estas gráficas permite establecer que la intensidad mayor en la región de alto peso molecular, en el trazado correspondiente a Hpa II (línea llena) con respecto al de Msp I (línea cortada), representa la principal población de especies que contienen internamente la secuencia C-5mC-G-G. Esto concuerda con la mayor absorbancia en la zona de tamaño molecular más pequeño de los trazados de Msp I, como se describió en el caso anterior.

A su vez, el estudio comparativo de los trazados normal y tumoral indica que la población señalada como rica en fragmentos con C-5mC-G-G se halla aumentada en ADN normal (figura 29, panel A)

Por otra parte, la comparación de los perfiles correspondientes a ADN de tejido carcinomatoso y de la línea celular T47D (figura 29, panel C), muestra que Hpa II cliva a este último en fragmentos de menor longitud que al primero. Ello se deduce del corrimiento observado en el trazado de T47D hacia la derecha, o frente de corrida electroforética. En otros términos, la línea celular posee más sitios C-C-G-G cuyas citosinas internas no se hallan metiladas.

Nuevamente se evidencia que el ADN tumoral se halla hipometilado con respecto al normal, mientras que el proveniente de la línea T47D se halla aún más hipometilado que el primero.

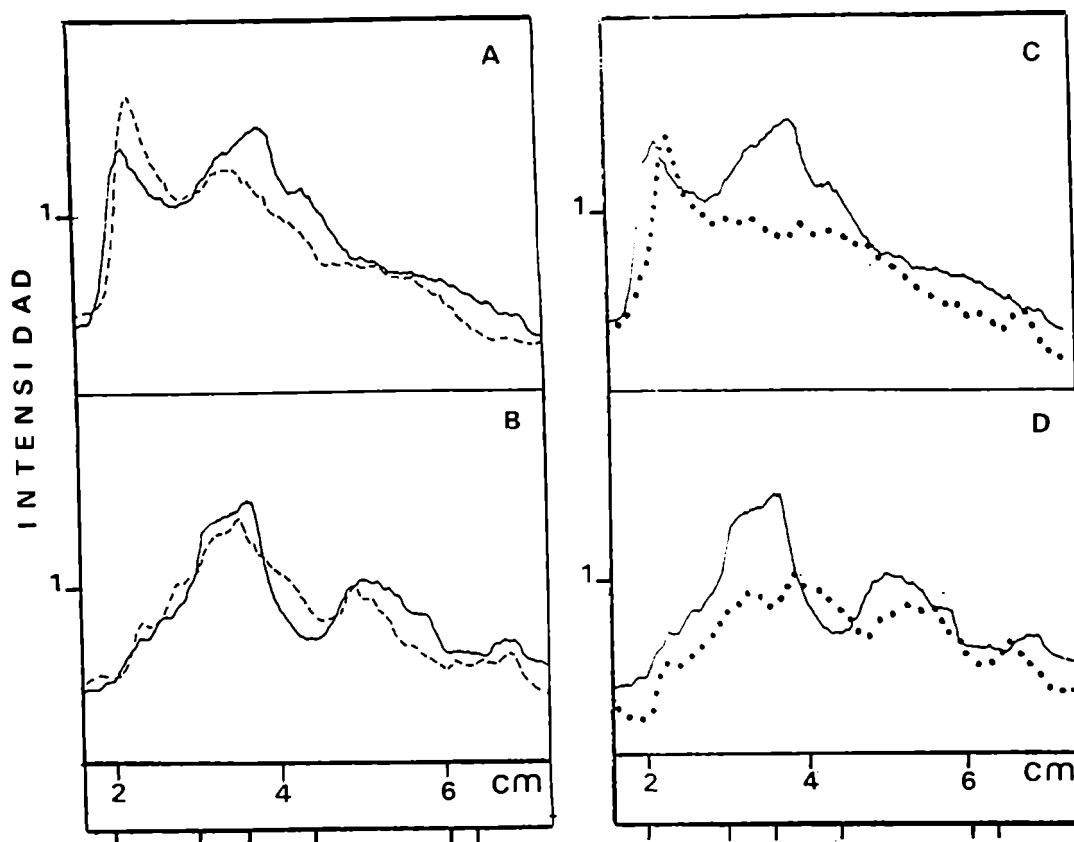


FIGURA 29: Análisis comparativo de los densitogramas correspondientes a digeridos normales, tumorales y de la línea celular T47D de la figura 27

Cada carril de la placa autorradiográfica de la figura 27 fue analizado por densitometría a 590 nm.

Panel A: ADNs normal y tumoral digeridos con Hpa II

Panel B: ADNs normal y tumoral digeridos con Msp I

Panel C: ADNs tumoral y de T47D digeridos con Hpa II

Panel D: ADNs tumoral y de T47D digeridos con Msp I.

- - - ADN de tejido normal; — ADN de tejido tumoral; ADN de T47D

Las unidades de intensidad de absorbancia son arbitrarias.

La escala superior corresponde a la migración, expresada en cm.

La escala inferior indica la posición de los fragmentos marcadores de tamaño molecular empleados en la figura 27.

IIIB.2. ESTUDIO SOBRE DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO RELATIVO DE 5mC EN ADNs PROVENIENTES DE CELULAS MAMARIAS HUMANAS NORMALES Y NEOPLASICAS

Los ensayos realizados para estudiar los patrones de distribución de 5mC en ADNs purificados de células mamarias humanas normales y neoplásicas, sugerían una gradación en la abundancia de segmentos conteniendo la secuencia C-5mC-G-G: El ADN proveniente de células de tejido mamario normal presentaba un cierto grado de hipermetilación, al menos en la secuencia reconocida por Hpa II o Msp I. El ADN de carcinoma homólogo se encontraba en una situación intermedia, mientras que el purificado de la línea T47D mostró ser el más hipometilado.

Como la metodología aplicada en el punto anterior sólo permite detectar cambios producidos en la secuencia C-C-G-G, lo cual no representa la totalidad de los sitios C-G metilables en el genoma, se decidió completar el presente estudio ampliando dicho enfoque.

Es así que, para apoyar la certeza de los mencionados hallazgos, se determinó el contenido relativo de 5mC mediante el empleo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

IIIB.2.1. Optimización del sistema cromatográfico

La separación de componentes de una mezcla por medio de una tecnología tan sensible como lo es HPLC requiere generalmente una optimización particular para cada tipo de sistema a utilizar.

La disponibilidad de columnas para estos ensayos fue relativamente escasa, contando sólo con tres tipos diferentes. Como en la literatura no se han descrito condiciones aptas para la separación de los componentes de ácidos nucleicos en ninguna de las columnas mencionadas, fue necesario determinarlo en forma experimental.

Tras varios ensayos, se decidió emplear la columna CGC(C₁₈), puesto que entre otras ventajas, poseía el menor diámetro interno, aumentando así la resolución.

Para monitorear la apropiada separación de las bases de ADN, se utilizaron en primera instancia, soluciones de bases marcadoras, C, G, T y A de concentración 40 uM, 56 uM, 71 uM y 39 uM.

En la figura 30 se reproduce la separación obtenida al emplear como solvente fosfato de amonio 0,2 M pH 3,5. La muestra inyectada consistió en 10 ul de una mezcla de volúmenes iguales de las soluciones mencionadas, monitoreando la elución por A₂₈₀.

De acuerdo a ensayos preliminares, se pudo determinar que el material eluído hasta los 2 minutos post-inyec-

ción de la muestra corresponde a contaminantes del solvente o de la columna, y no fue tenido en cuenta.

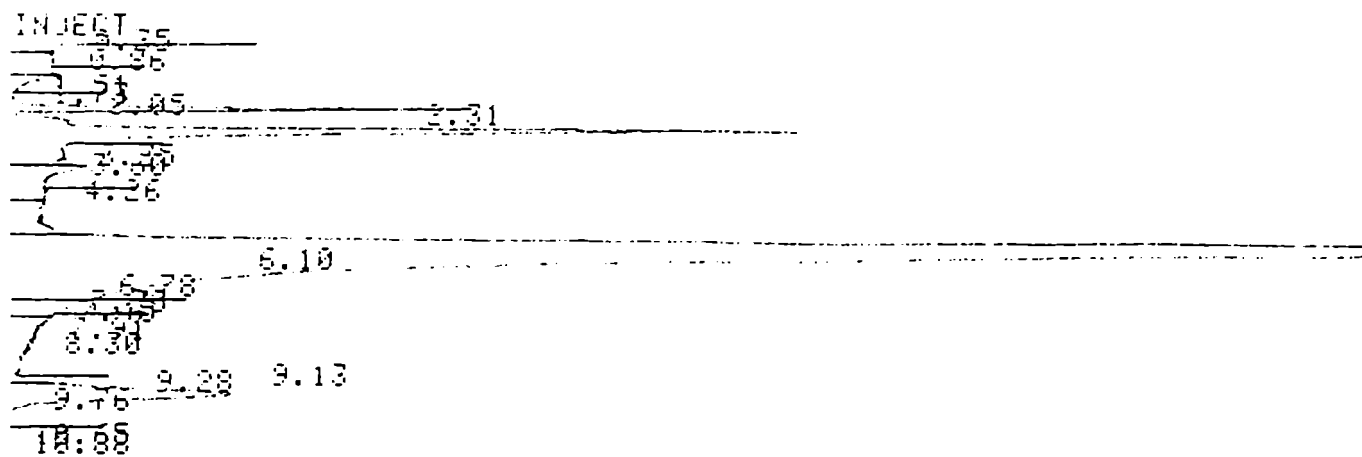


FIGURA 30: Cromatograma de solución de bases marcadoras eluída con fosfato de amonio 0,2 M pH 3,5

10 μ l de una solución de C, G, T y A de concentración final 10 μ M - 14 μ M - 17,8 μ M y 9,8 μ M respectivamente, se sembraron en una columna CGC(C₁₈). La elución se realizó con fosfato de amonio 0,2 M pH 3,5. Presión = 1000 psi. Flujo = 0,6 ml/min
Velocidad de papel = 0,5 cm/min Escala de absorbancia = 100% = 0,2 U.

Pueden observarse 3 picos principales, eluyendo a 2,46, 6,41 y 9,54 minutos respectivamente. Por datos publicados previamente (157), se supone que corresponderían a citosina, guanina superpuesta con adenina, y timina respectivamente.

Se ensayaron entonces condiciones diferentes, para resolver los dos compuestos co-eluidos, como ser la disminución de la fuerza iónica y aumento del pH, como se ilustra en la figura 31.

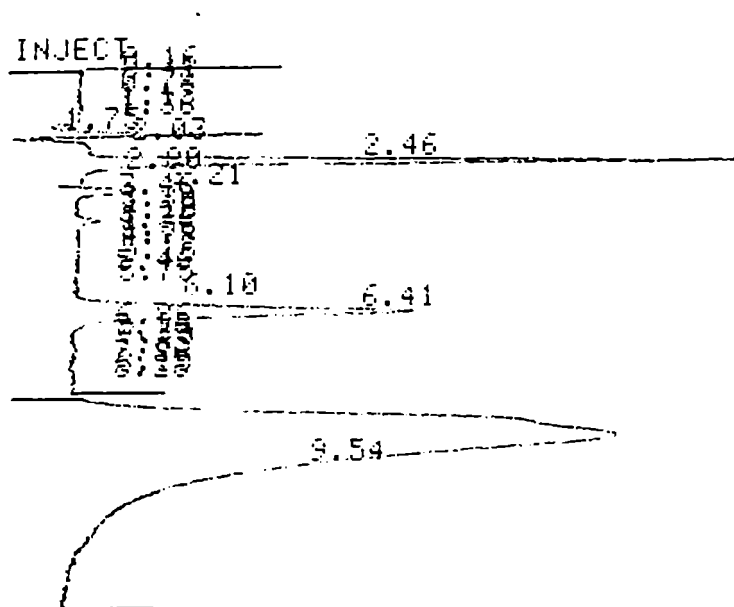


FIGURA 31: Cromatograma de solución de bases marcadoras eluída con fosfato de amonio 0,1 M pH 4,1

Las condiciones fueron idénticas a las de la figura 30, exceptuando la concentración y pH del solvente empleado.

En este caso, el tercer pico parece corresponder dos compuestos sumados. Probablemente adenina es la base que más modificó su comportamiento (157), pasando desde el 2° al 3er. pico de elución.

Dada la mala resolución de los 4 componentes de la mezcla, se decidió estudiar el efecto del cambio gradual en la fuerza iónica y pH del solvente, empleando un gradiente 100% fosfato de amonio 0,1 M pH 4,1 a 100% fosfato de amonio 0,2 M pH 3,5 (figura 32)

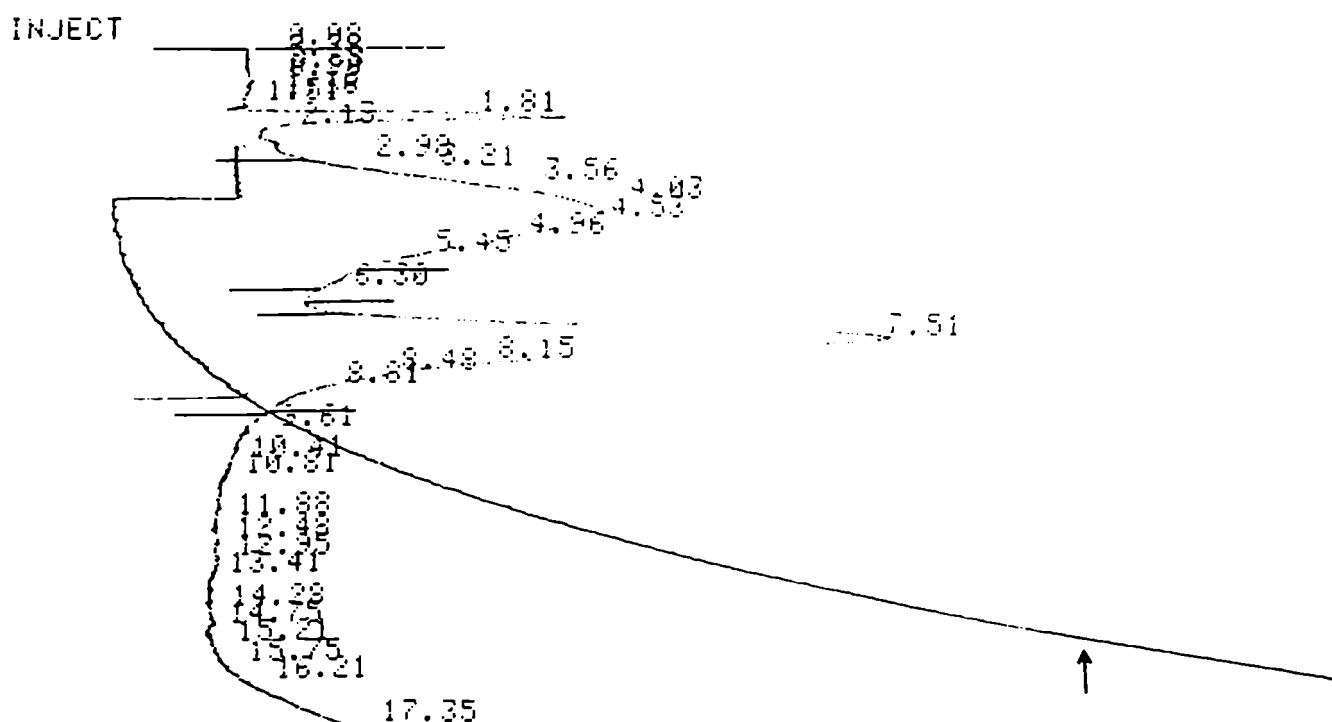


FIGURA 32: Cromatograma de solución de bases marcadoras eluída con fosfato de amonio en ler. gradiente de concentración y pH.

Las condiciones fueron idénticas a las enumeradas en la figura 30. La elución se realizó con gradiente cuyo punto inicial correspondió a 100% fosfato de amonio 0,1 M pH 4,1 y el final a 100% de fosfato de amonio 0,2 M pH 3,5.

La curva señalada con una flecha indica la proporción relativa de la solución final en la inicial (0% a 100%)

Nuevamente se resolvieron sólo 3 picos, siendo el intermedio la suma de dos componentes probablemente, puesto que está muy extendido.

Se empleó a continuación el mismo gradiente en la elución, pero con diferentes proporciones intermedias. Para aumentar la detección de adenina, cuyo coeficiente de extinción a 280 nm es relativamente bajo, se elevó su concentración relativa en la mezcla sembrada, como puede observarse en la figura 33.

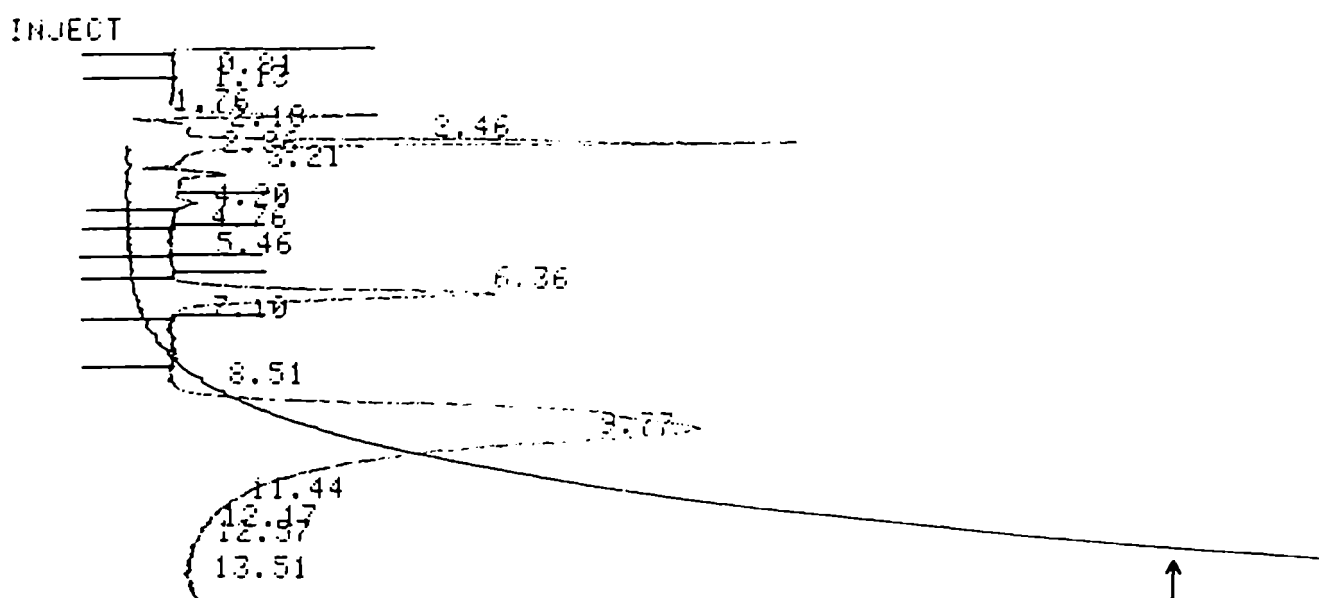


FIGURA 33: Cromatograma de solución de bases marcadoras eluída con fosfato de amonio en 2° gradiente de concentración y pH.

15 μ l de una solución conteniendo citosina 13 μ M, timina 24 μ M, adenina 198 μ M y guanina 18 μ M fueron resueltos como se indicó en la figura 32. Los puntos inicial y final de la curva correspondiente al

gradiente coinciden con los de la figura anterior, pero la condición final fue alcanzada más rápidamente.

Puesto que aún se resolvían 3 picos únicamente, se ensayó un tercer gradiente, con iguales puntos inicial y final que en los anteriores, pero lineal, resultando el perfil ilustrado en la figura 34.

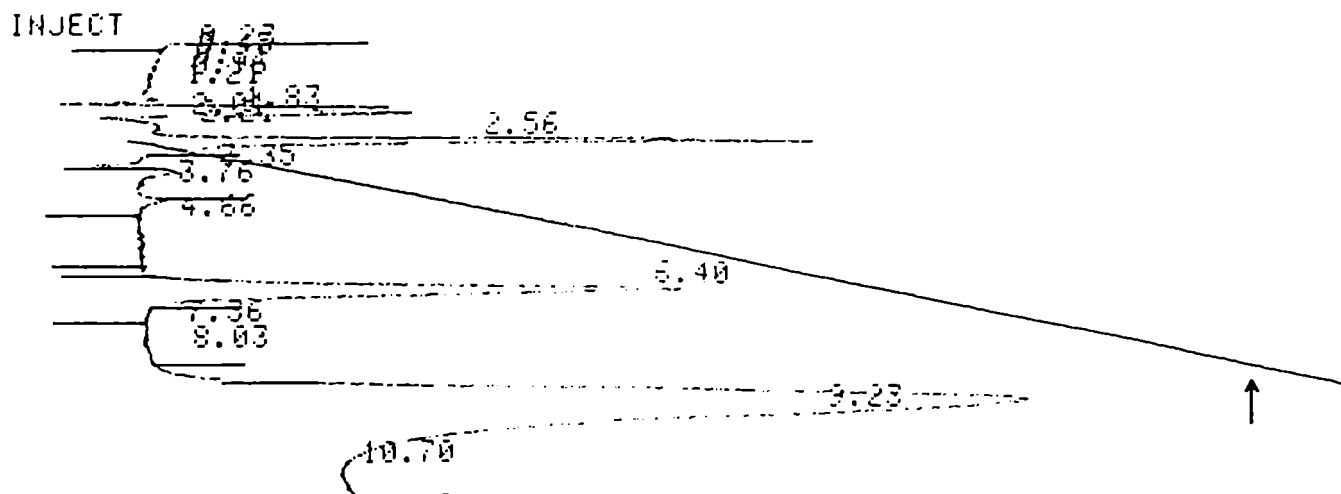


FIGURA 34: Cromatograma de solución de bases marcadoras eluída con fosfato de amonio en 3er. gradiente de concentración y pH

Las condiciones fueron idénticas a las de la figura 33, empleando el gradiente en forma lineal (curva señalada con una flecha)

La obtención de 3 picos nuevamente indicó que estos gradientes no eran apropiados.

Finalmente, se ensayó como solvente fosfato de amonio 0,1 M pH 4,5, sembrando una mezcla conteniendo 63 uM, 43 uM, 110 uM y 760 uM de C, G, T y A respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

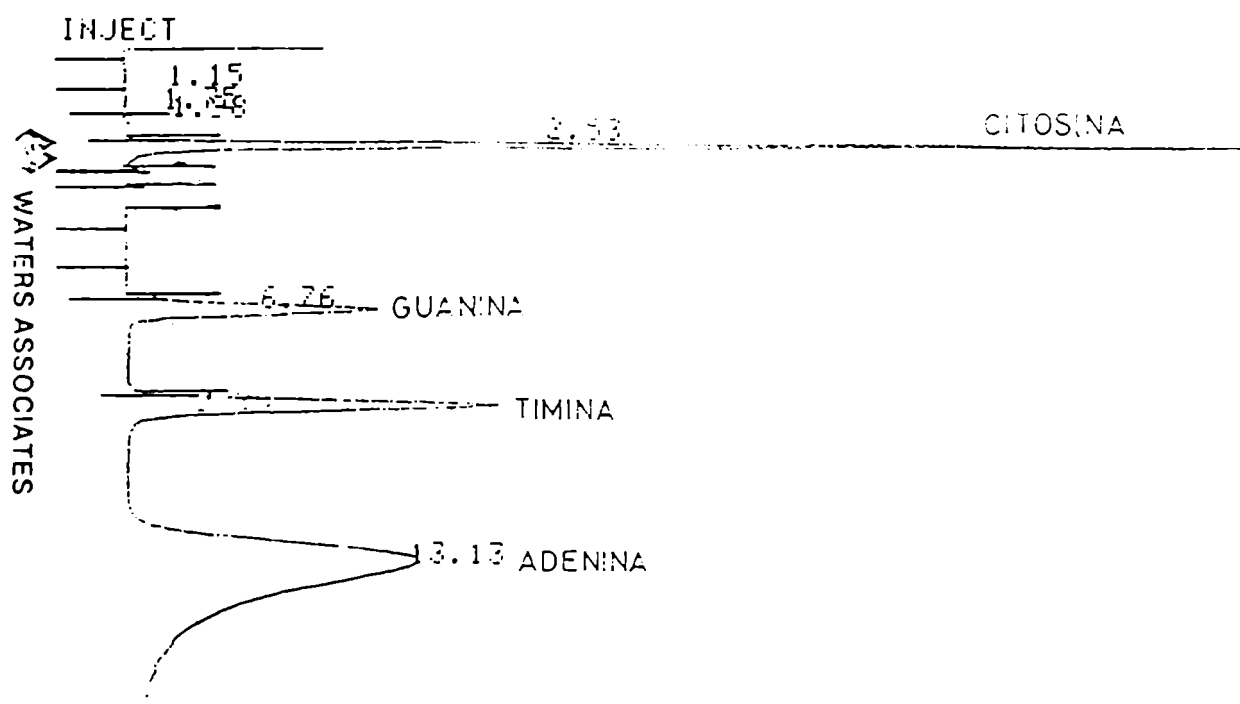


FIGURA 35: Cromatograma de solución de bases marcadoras eluída con fosfato de amonio 0,1 M pH 4,5

20 ul de una solución conteniendo citosina 63 uM, guanina 43 uM, timina 110 uM y adenina 760 uM fueron eluídos con fosfato de amonio 0,1 M pH 4,5.

Presión = 1000 psi Flujo = 0,6 ml/min Velocidad papel = 0,5 cm/min
Escala de absorbancia : 100% = 0,1 U.

Bajo estas condiciones, se separaron correctamente los 4 componentes, cuyos tiempos de retención fueron 2,53 - 6,76 - 9,20 y 13,13 minutos. Cromatografiando por separado cada uno de los compuestos de la mezcla en idénticas condiciones, se determinó que correspondían a C, G, T y A respectivamente.

Se concluyó por tanto que fosfato de amonio 0,1 M pH 4,5 sería en adelante el solvente de elución apropiado.

Puesto que las muestras a analizar correspondían a hidrolizados de ADN con ácido fórmico, se estudió si dicho compuesto contenía impurezas capaces de interferir con la interpretación de los resultados. Para ello, una alícuota de ácido fórmico fue calentada, evaporada y resuspendida en el solvente a emplear, imitándose las condiciones de las posteriores cromatografías. Como se muestra en la figura 36, no se detectó ningún compuesto contaminante en las condiciones ensayadas.

Se analizaron entonces 10 ul de solución de hidrolizado de ADN de salmón para estudiar el real comportamiento de los componentes de una muestra tratada con ácido fórmico, y determinar el pico correspondiente a 5mC. Se observa que de esta forma (figura 37) a los 4,38 minutos se eluye un compuesto, cuya proporción correspondería a la esperada para 5mC.

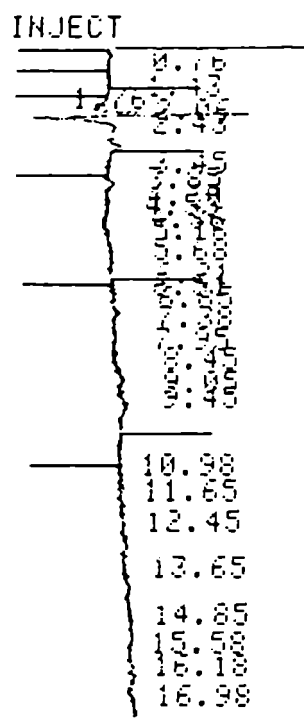


FIGURA 36: Cromatograma correspondiente a una muestra "blanco" de ácido fórmico.

100 ul de ácido fórmico 90% fueron calentados a 175°C durante 1 hora, evaporados a sequedad, resuspendidos en 20 ul de solvente de elución, y cromatografiados en las condiciones señaladas en la figura 35.

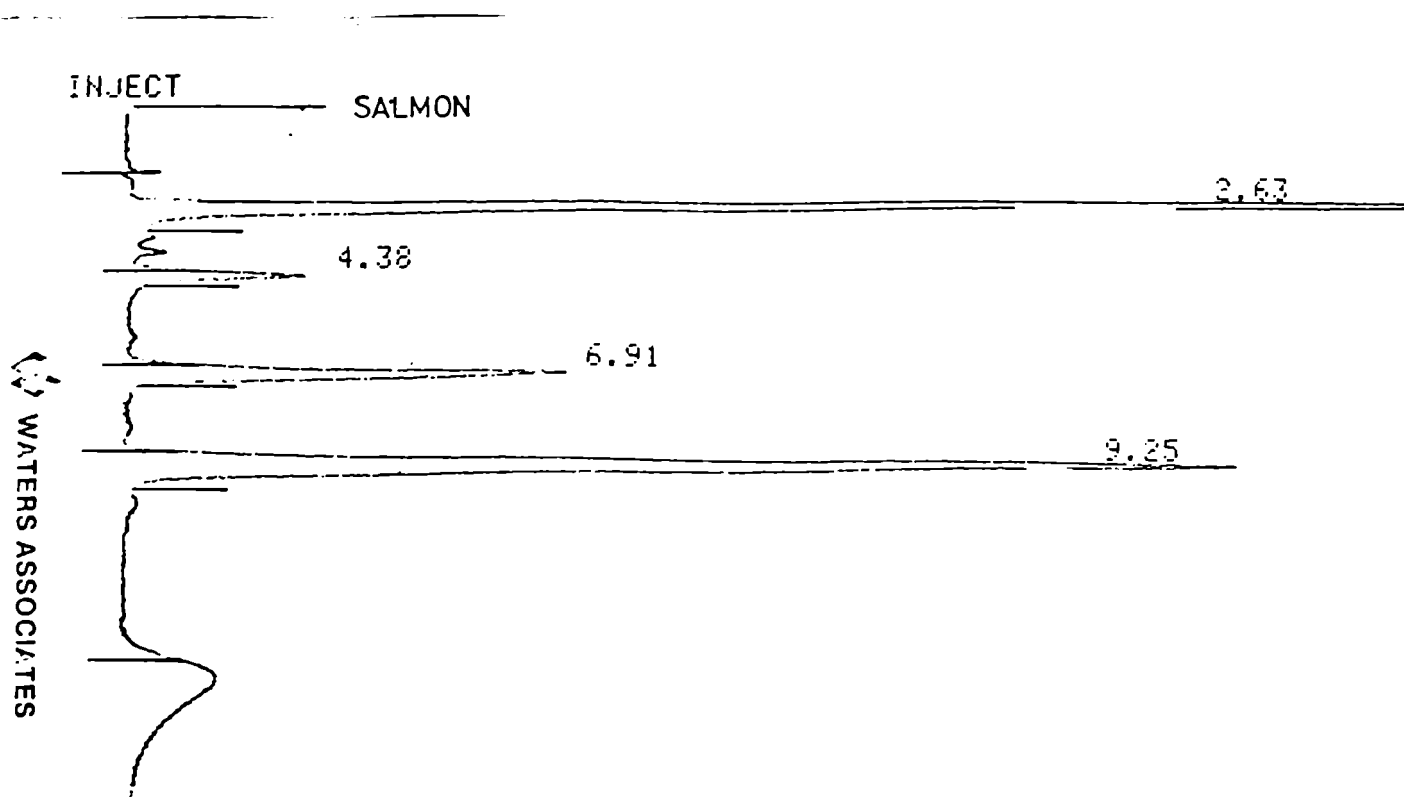


FIGURA 37: Cromatograma de ADN de salmón hidrolizado

ADN de salmón fue hidrolizado con ácido fórmico 90%, a 175°C durante 1 hora y resuspendido en fosfato de amonio 0,1 M pH 4,5 (1 mg ADN hidrolizado/ml). 10 ul del material solubilizado fueron analizados en idénticas condiciones a las enunciadas en la figura 35.

Efectivamente, alícuotas de una solución de 5mC pura, cromatografiadas en las mismas condiciones, mostraron que este compuesto presenta un tiempo de retención que oscila entre 4,2 y 4,4 minutos.

Por lo tanto, se concluyó que estas condiciones eran óptimas para la separación de bases correspondientes a ADN hidrolizado.

IIIB.2.2. Hidrólisis del ADN

En el presente estudio, se emplearon los ADN altamente purificados mencionados en los puntos IIIB.1.1. y IIIB.1.2, provenientes de dos pares de biopsias mamarias humanas normales-tumorales, como así también de la línea celular T47D.

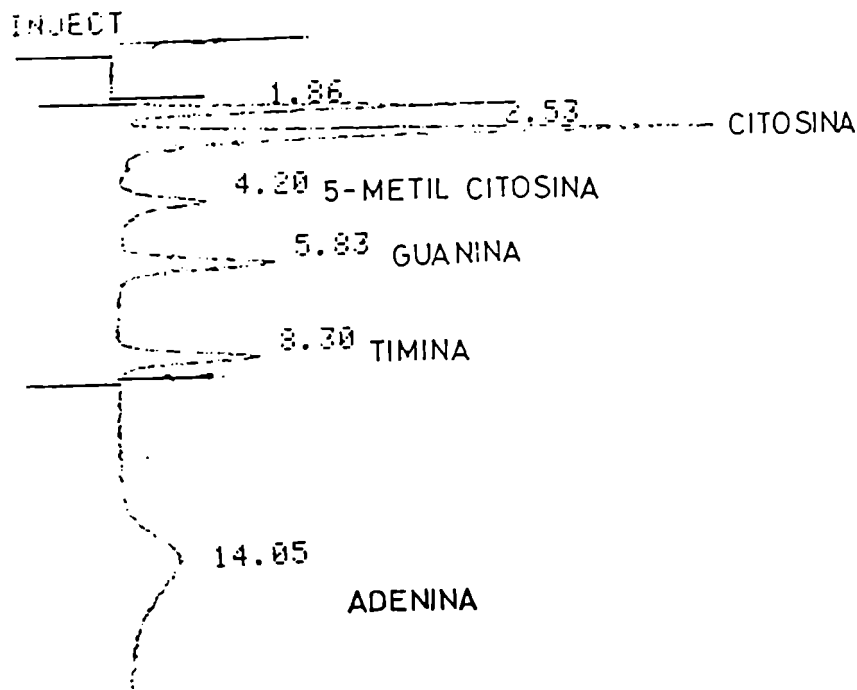
Como se indicara previamente (II.3.14.), alícuotas de cada ADN fueron hidrolizadas en presencia de ácido fórmico 90%, a 175°C durante 1 hora, resuspendiendo los hidrolizados en el solvente de elución cromatográfica.

IIIB.2.3. Análisis del contenido relativo de 5mC

10 - 50 ul de cada hidrolizado fueron analizados por HPLC como se describió en II.3.15., de acuerdo a las condiciones ya optimizadas.

Para identificar y cuantificar la cantidad de las bases presente en cada muestra, se emplearon soluciones de bases marcadoras (figuras 38 y 39).

Las figuras 40 a 42 ilustran perfiles típicos de las diferentes muestras ensayadas, como así también las calibraciones (figuras 38 y 39), puesto que cada una de ellas fue ensayada por lo menos 3 veces.



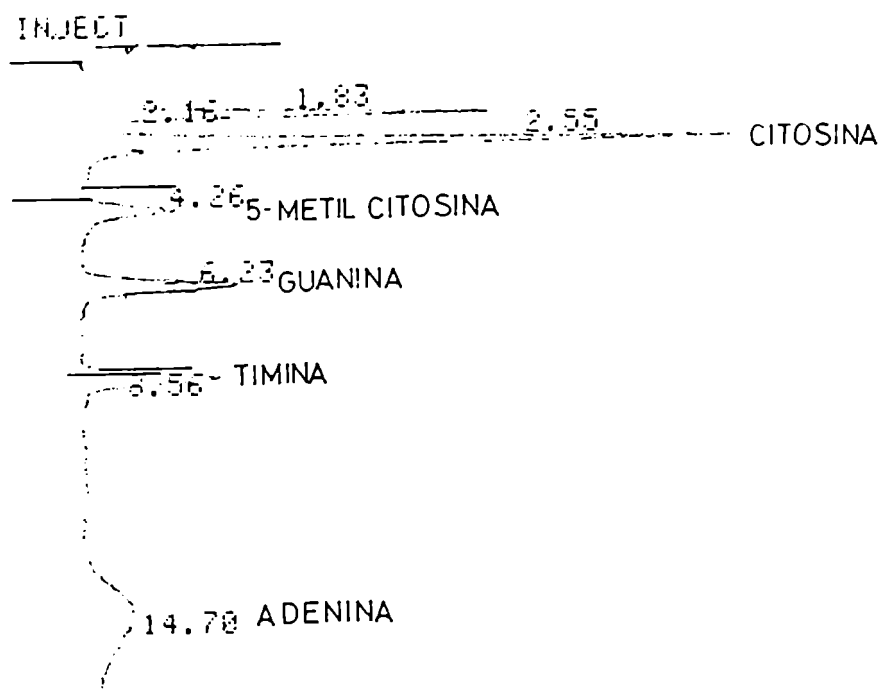
PRESSURE 900.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 0.60 ML/
 DETECTOR 280/050
 COLUMN CGC (C₁₈) SOLVENT PO₄H₂NH₄ 0.1M
 pH 4.50
 CALIBRATION

| PEAK# | AMOUNT | RT | AREA |
|-------|---------|-------|-----------|
| C 1 | 8.12000 | 2.53 | 1996534 F |
| 5mC 2 | 1.34000 | 4.20 | 467102 F |
| G 3 | 2.33000 | 5.83 | 696810 F |
| T 4 | 4.95000 | 8.30 | 434030 L |
| A 5 | 0.23200 | 14.05 | 222991 F |

FIGURA 38: Ejemplo de calibración por integración de áreas

25 ul de una solución conteniendo T, G, A, C y 5mC en concentraciones de 19,78 - 9,32 - 92,8 - 32,5 y 5,375 uM respectivamente, fueron eluidos con fosfato de amonio 0,1 M pH 4,5. Presión = 900 psi Flujo = 0,6 ml/min Velocidad del papel = 0,5 cm/min Escala de Absorbancia: 100% = 0,05 U.A.₂₈₀. (RT = Tiempo de retención).

El cromatógrafo fue calibrado de acuerdo a las cantidades sembradas (Amount), expresadas como umoles x 10⁻⁸, de cada base, por integración de las áreas comprendidas bajo los picos de elución.

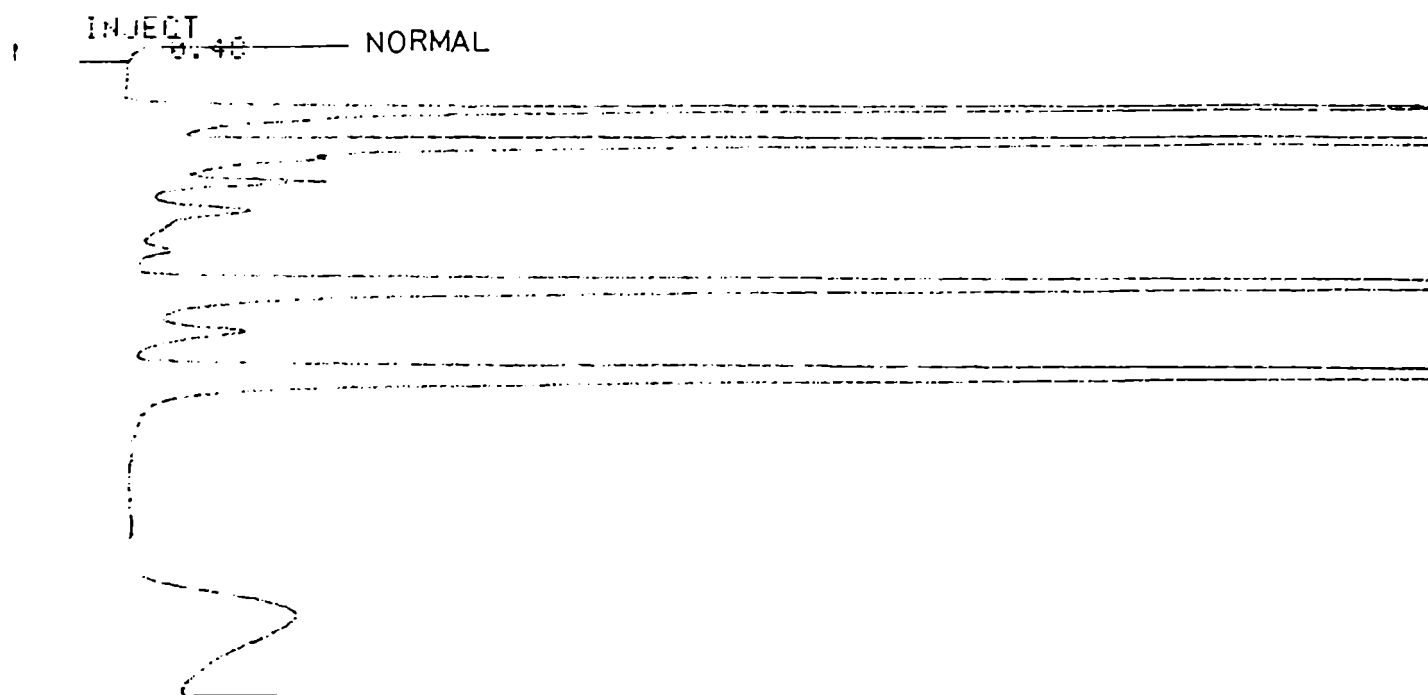


PRESSURE 900.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 0.60 ML/MIN
 DETECTOR 280/050
 COLUMN CGC (C18) SOLVENT PO₄H₂NH₄ 0.1 M OPR ID:
 pH 4.50
 CALIBRATION

| PEAK# | | AMOUNT | RT | HEIGHT |
|-------|------|---------|-------|---------|
| 1 | C | 8.12000 | 2.55 | 12394 F |
| 2 | 5-mC | 1.34000 | 4.26 | 1585 F |
| 3 | G | 2.33000 | 6.23 | 2991 F |
| 4 | T | 4.95000 | 8.56 | 981 F |
| 5 | A | 0.23200 | 14.70 | 1015 HL |

FIGURA 39: Ejemplo de calibración por integración de alturas

La calibración se realizó como se indicó en la figura 38, por integración de la altura de cada pico de elución.

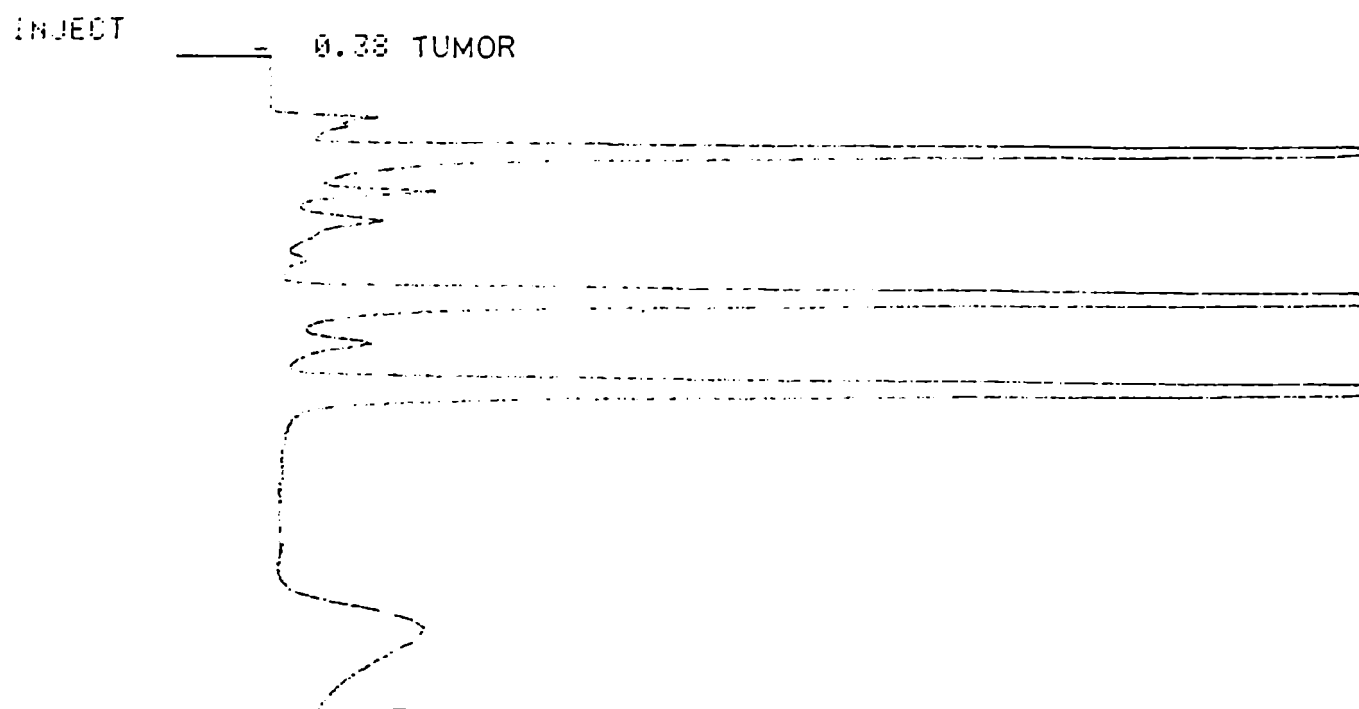


EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

| PEAK# | AMOUNT | RT | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|---------|
| 1 | 41.57200 | 2.66 | 63459 F |
| 2 | 2.23355 | 4.41 | 3642 F |
| 3 | 39.45400 | 6.41 | 50647 F |
| 4 | 223.50400 | 8.71 | 44302 F |
| 5 | 0.63363 | 14.88 | 2773 HL |
| TOTAL | 307.39800 | | |

FIGURA 40: Ejemplo de análisis de hidrolizado de ADN proveniente de tejido mamario normal

35 ul de ADN normal hidrolizado (0,25 mg ADN hidrolizado/ml aproximadamente) fueron analizados según las condiciones expresadas en la figura 38, y cuantificados por integración de la altura de cada pico de elución.

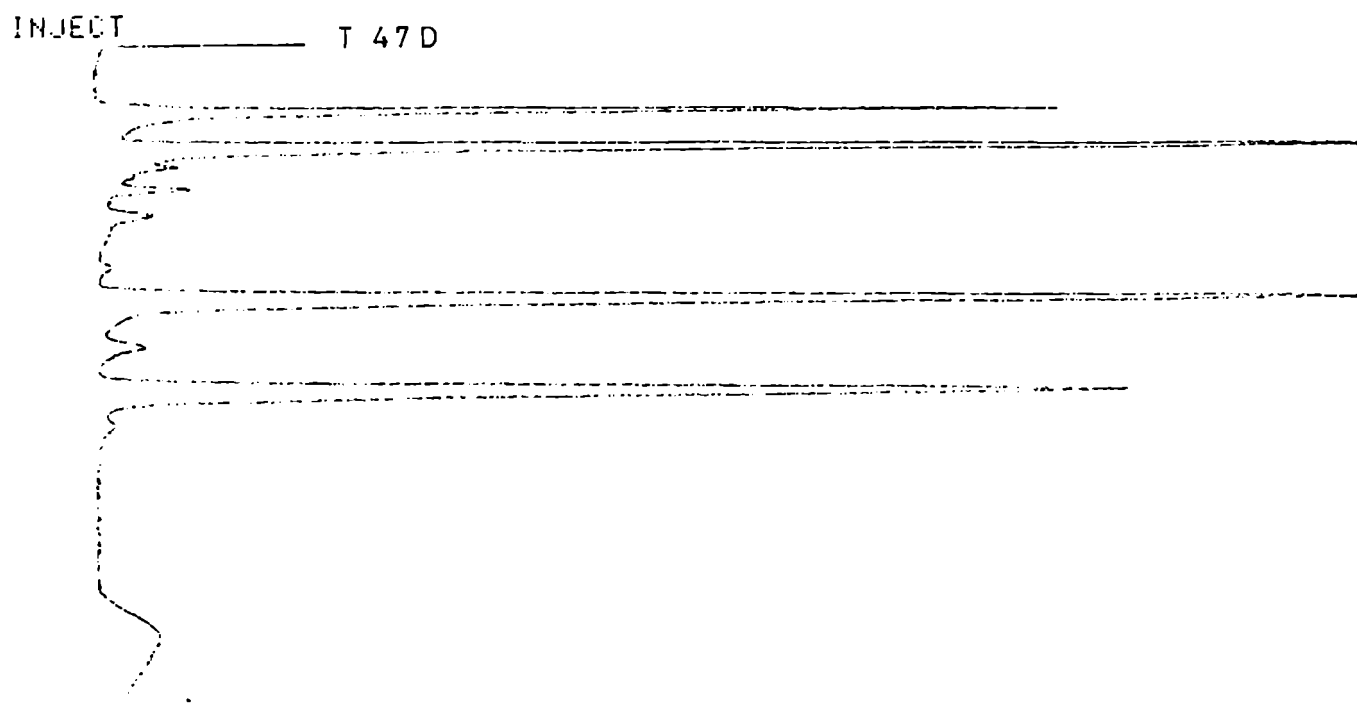


EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

| PEAK# | AMOUNT | RT | EXP RT | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|---------|
| 1 | 35.93350 | 2.68 | | 54852 F |
| 2 | 1.13115 | 4.41 | | 1338 EF |
| 3 | 41.61570 | 6.41 | | 53422 F |
| 4 | 204.64000 | 8.73 | | 40563 L |
| 5 | 0.61900 | 14.88 | | 2709 HL |
| TOTAL | 283.93900 | | | |

FIGURA 41: Ejemplo de análisis de hidrolizado de ADN proveniente de tejido mamario tumoral

35 ul de ADN tumoral hidrolizado (0,25 mg ADN hidrolizado/ml aproximadamente) fueron analizados como se indicó en la figura 40.



EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

| PEAK# | AMOUNT | RT | HEIGHT |
|-------|----------|-------|---------|
| 1 | 17.93360 | 2.65 | 29380 F |
| 2 | 0.86200 | 4.38 | 1398 F |
| 3 | 21.18050 | 6.50 | 25036 F |
| 4 | 4.50816 | 8.83 | 2348 F |
| 5 | 0.00000 | 15.23 | 810 HL |
| TOTAL | 44.48430 | | |

FIGURA 42: Ejemplo de análisis de hidrolizado de ADN proveniente de la línea celular T47D

15 ul de hidrolizado de ADN de la línea celular T47D (0,25 mg ADN hidrolizado/ml aproximadamente) fueron analizados de acuerdo a lo señalado en la figura 40.

Los valores obtenidos, luego de varias determinaciones para cada muestra, se hallan resumidos en la Tabla VIII.

| FUENTE de ADN | % 5mC = $\frac{5mC}{5mC + C} \times 100 \pm 1 \text{ D.S.}$ | Número de Determinaciones |
|----------------|---|---------------------------|
| Tejido normal | 5,03 \pm 0,45 | 5 |
| Tejido tumoral | 3,35 \pm 0,28 | 6 |
| Línea T47D | 1,63 \pm 0,30 | 3 |

TABLA VIII: Porcentaje relativo de 5mC en ADNs provenientes de células mamarias humanas normales y neoplásicas.

Alícuotas de ADN purificado fueron hidrolizadas en ácido fórmico 90%, a 175°C durante 1 hora. Cada hidrolizado fue evaporado a sequedad con nitrógeno gaseoso y resuspendido en fosfato de amonio 0,1 M pH 4,5 (0,25 - 1 mg ADN hidrolizado/ml).

10-50 ul de cada muestra fueron analizados por HPLC. La elución se realizó con la misma solución de resuspensión, con un flujo de 0,6 ml/min, a 900-100 psi, y monitoreada por A₂₈₀. Las bases fueron identificadas con respecto al tiempo de retención de bases marcadoras. La proporción total de las bases se calculó por integración de las alturas o áreas comprendidas bajo los picos de elución, corregido por el coeficiente de extinción en la solución de resuspensión-elución. D.S.= Desviación standard.

La comparación de estos datos indica que son consistentes con los observados por análisis de los patrones de restricción: Los niveles de 5mC en ADN de tejido normal (5,03% \pm 0,45) fueron mayores que aquéllos encontrados para ADN tumoral (3,35% \pm 0,28), mientras que la línea celular mostró el contenido más bajo (1,63% \pm 0,30).

Con estos ensayos se completó el presente estudio, que será discutido a continuación.

IV. DISCUSION

En primer lugar, se comentarán algunos aspectos generales sobre la metodología empleada.

Todos los ensayos hasta aquí presentados se basan en la comparación de datos obtenidos entre ADNs purificados de tejidos mamarios humanos normales y tumorales. Es importante remarcar entonces, que dicha comparación se realizó siempre, como fuera mencionado para cada caso particular, entre ADNs provenientes de biopsias de una misma paciente, sometidos paralelamente a idénticos procedimientos. De esta manera, toda diferencia hallada se debe a características propias del estado normal o transformado de sus células constitutivas, y no a variaciones individuales.

En el presente estudio, se emplearon alternativamente dos procedimientos para purificar ADN (II.3.2.1. y II.3.2.2.). El primero consistió en incluir durante los primeros pasos, agentes altamente caotrópicos como son las sales de guanidina, capaces de inactivar rápidamente cualquier nucleasa presente en la homogenización. Ello obedeció a la necesidad de obtener ARN de los mismos tejidos, para posterior análisis de los mensajeros biológicamente activos. Como se señalara anteriormente, dicha técnica fue descripta para este fin específico (151). Por lo tanto su utilización en el aislamiento de ADN requirió de ensayos previos que aseguraran un

rendimiento aceptable, de material con características propias de este ácido nucleico.

Esto no fue necesario cuando se aplicó la técnica alternativa, la cual se utiliza clásicamente desde hace años, y ha sido optimizada en nuestro laboratorio.

De todas maneras, el uso de dos procedimientos de purificación, no interfiere con los resultados obtenidos. En cada serie de ensayos, se compara el comportamiento de ADN normal y neoplásico, los cuales fueron obtenidos exactamente de la misma forma.

Los dos métodos generalmente empleados para la disociación del ADN consisten en tratamiento alcalino ó exposición a altas temperaturas en bajas concentraciones salinas. Se prefirió este último, puesto que la desnaturalización alcalina no disuelve los agregados y redes que suelen formar las cadenas de ADN (143).

Considerando que la clasificación del ADN en diferentes categorías, según el tipo de secuencias -invertidas, repetitivas y únicas- se define en forma operacional, es necesario especificar las condiciones en las cuales se establece dicha clasificación.

Se ha descripto que numerosos factores afectan las reasociaciones moleculares (15, 143, 144), además de la con-

centración del ADN y tiempo de incubación incluídos en el término Cot . Por variación de los mismos es posible modificar la velocidad con que ocurren tales eventos, y por tanto el porcentaje de ADN reasociado al valor Cot en cuestión.

El incremento en la concentración de cationes monovalentes empleados, generalmente Na^+ , aumenta la velocidad de reasociación. Como se mencionara previamente, tal variación se encuentra tabulada de modo que puede corregirse el valor Cot establecido a un $ECot$, bajo una concentración salina determinada (factor \mathfrak{D}). La presencia de tales cationes es indispensable, puesto que a una concentración menor de 0,01 M de Na^+ , la reasociación se ve francamente inhibida.

En cambio, han sido evitados los cationes divalentes, que pueden inducir degradación catalítica, activar trazas de nucleasas presentes, o afectar la velocidad de reacción (143).

Por otra parte, la presencia de agentes quelantes como el EDTA en concentraciones mayores de 2 mM inhiben la afinidad de la HAP por ADN bicatenario.

La temperatura óptima de reasociación se encuentra a 25°C-30°C por debajo de la temperatura de fusión media (T_m) característica de cada ADN. Se define como "criterio" a la

diferencia entre la temperatura de incubación y la T_m , a determinada fuerza iónica, bajo las cuales se realiza la reasociación, ya que controla la calidad de los híbridos obtenidos. La temperatura elegida fue de 60°C, seleccionando así aquéllos híbridos casi perfectos, estables al calor (aunque en menor grado que el ADN nativo). Dada la existencia de familias de secuencias repetitivas cuyos miembros son parecidos pero no idénticos entre sí (23, 144), se intentó evitar la formación de híbridos imperfectos.

El criterio utilizado para la reasociación coincidió con el aplicado para la selección cromatográfica de los híbridos formados. La variación en la temperatura durante la cromatografía en HAP, puede promover la formación de híbridos no deseados, o bien la desnaturalización de los ya reasociados. De esta manera se simplifica la interpretación y otorga reproducibilidad en el método.

La cromatografía en HAP ha sido escogida entre otros procedimientos, dada su habilidad y rapidez para recuperar tanto la fracción reasociada como también la de ADN simple cadena (143). Las condiciones salinas y térmicas durante el fraccionamiento en estas columnas, fueron cuidadosamente mantenidas, puesto que variaciones en alguno de estos parámetros pueden alterar las propiedades de retención.

Se ha descrito que la unión irreversible y/o inespecí-

fica y capacidad máxima suelen variar entre diferentes lotes de HAP. Por lo tanto, se realizó un control de la cromatografía bajo condiciones experimentales a emplear (fragmentos de 2 Kbp, siembra en HAP equilibrada con PB 0,12 M, elución con PB 0,4 M, 60°C, 200 ug ADN/ml HAP), verificando que se trabajaba en condiciones adecuadas.

Cuando la reasociación fue seguida inmediatamente por digestión con nucleasa S_1 , se evitó en la reacción la presencia de iones fosfato, que inhiben a la enzima, reemplazando el PB por NaCl. Asimismo, cuando las digestiones se realizaron sobre ADN-sonda radiactivo, se ensayó previamente la cantidad de ADN de salmón requerida para proteger de la hidrólisis a los segmentos doble cadena marcados (cuando la enzima se halla en exceso, es capaz de digerirlos). El primero de estos ensayos se realizó a 45°C, temperatura recomendada para disminuir la actividad de posibles nucleasas inespecíficas presentes. En estas condiciones, se observó la digestión de un 70% de ADN marcado. A dicha temperatura, algunos puentes de hidrógeno podrían disociarse, y por tanto sería posible encontrar pequeñas porciones desnaturizadas accesibles a la nucleasa. Para prevenir este efecto, las siguientes digestiones se realizaron a 37°C, y en presencia de ADN de salmón doblecatenario, como protector de la sonda. La hidrólisis en estas condiciones de aproximadamen-

te un 55% de la sonda no pudo ser disminuída (Tabla VII). Sin embargo, fue considerado aceptable, puesto que es lógico suponer que ciertas regiones permanecieran como simple cadena. Además, debe recordarse que dicho ADN estaba seguramente contaminado con radiactividad no incorporada, como se deduce del análisis de la figura 12 (perfil de cpm totales superior al de cpm TCA precipitable; primer pico de elución no bien definido).

El tamaño de los fragmentos de ADN a reasociar también es importante para el análisis de las fracciones obtenidas. Las secuencias invertidas son generalmente muy cortas -400 bp- encontrándose frecuentemente intercaladas con otras secuencias del genoma. Durante la reasociación, se forman redes mantenidas por diferentes secuencias hibridadas. Si los fragmentos fueran muy largos, algunas porciones no serían estéricamente accesibles, y por tratamiento con S_1 podrían perderse secuencias deseadas. Si los fragmentos fueran muy pequeños, las secuencias serían fracturadas y luego de la hibridación, no denotarían su frecuencia natural. Por ejemplo, Schmid y col. encontraron (15) que las secuencias invertidas constituyen un 15% del genoma cuando se ensayan fragmentos de 4,4 Kbp, y el 40% si lo hacen con fragmentos de 22 Kbp sin posterior digestión con S_1 .

Se eligió por tanto un tamaño de 2 Kbp, aumentando así

la probabilidad de obtener secuencias invertidas intactas y disponibles para ser reasociadas, además de fragmentos libres de ellas.

Un razonamiento similar puede aplicarse a las secuencias repetitivas.

En el caso de ADN de metástasis en epiplón, se fraccionó en 6 Kbp, puesto que no fue posible fragmentarlo hasta segmentos más pequeños. El motivo de ello fue probablemente el hecho que la muestra consistió en una cantidad de más de un orden mayor que las demás. Concomitantemente, el volumen necesario para alcanzar la concentración óptima para el corte por pasaje por aguja hipodérmica, fue mucho mayor, requiriendo el uso de jeringas de un calibre diferente a las anteriores. Una leve variación en la presión efectuada, pudo provocar el rendimiento de fragmentos más largos que el tamaño habitual. Sin embargo, una longitud de 6 Kbp fue estimada apta a fines de una posterior reasociación en fase líquida.

El empleo de ADN heterólogo en el caso antedicho, obedeció a la necesidad de obtener gran cantidad de ADN reasociado a $Cot = 100$, para poder seleccionar posteriormente fragmentos de 300 bp por electroforesis preparativa. La enorme masa (superior a 200 gramos) de dicha metástasis, disponible en nuestro laboratorio, facilitó la extracción de

varios mg ADN a partir de una fracción de esta biopsia. La intención en esta serie de ensayos (IIIA.2.2.), fue de purificar secuencias del tipo Alu, descritas anteriormente, para su utilización como sonda. Esta familia de nucleótidos aparece como una banda mayoritaria de 300 bp entre los segmentos reasociados a Cot 68(23, 24). Efectivamente, el análisis electroforético de los híbridos obtenidos a este valor aproximadamente, mostró una banda mayoritaria correspondiente a 300 bp. Asimismo se evidenció otra, correspondiente a 4000 bp, no descripta anteriormente -debido probablemente al tamaño relativamente grande de los fragmentos a reasociar empleados, y al valor Cot = 100, ligeramente mayor-.

A pesar de las evidencias indicando que la banda de 300 bp hallada en IIIA.2.2. corresponde a los segmentos tipo Alu, su real identificación requiere ensayos de digestión con la endonucleasa Alu I: Por definición operacional, la familia Alu corresponde a aquellos segmentos reasociados a Cot = 68, de 300 bp, que poseen en el centro de su secuencia aproximadamente, un sitio de restricción para la endonucleasa Alu I. Por lo tanto, los segmentos de 300 bp purificados en este estudio son putativamente secuencias de tipo Alu, pero al no contar con dicha enzima y verificar la existencia de un sitio central para su restricción, no se puede aseverar su identidad.

Por otra parte, dada la alta proporción en que se en-

contraron los fragmentos de 4 Kbp, se consideró interesante su inclusión como sonda en ensayos de hibridación.

El método de corte mecánico por pasaje forzado a través de agujas hipodérmicas, fue seleccionado entre otros por su sencillez, reproducibilidad y mínima dispersión del tamaño de fragmentos obtenido.

Tanto la sonicación como el pasaje por prensa de alta presión (French press) de ADN fueron ensayados previamente. Sin embargo, produjeron segmentos cuyos tamaños oscilaron entre pocos bp, hasta varios miles, y fueron por tanto desechados.

El corte mecánico con homogenizador Omni-Mixer fraccionó parcialmente el ADN, hasta fragmentos demasiado largos para ser reasociados, pero permitió disminuir notablemente la viscosidad de las muestras, facilitando el posterior pasaje por aguja hipodérmica.

La marcación del ADN "in vitro" se realizó mediante el método de "corte-traducción" (148), que permite incorporar un nucleótido trifosfato - $\alpha^{32}\text{P}$ con elevada actividad específica. La uniformidad de la marcación depende del contenido de dicho nucleótido en el ADN, y la fidelidad de la síntesis es mantenida bajo condiciones experimentales controladas, ya que la cadena complementaria a la que está

re-sintetizada es utilizada como templado. La variabilidad del punto de máxima incorporación y la forma de las curvas de cinética, están regidas por la proporción relativa de actividad de las enzimas ADNasa I y ADN-polimerasa I, las cuales pueden incactivarse con distinta velocidad.

En los primeros casos, fue estudiada la cinética de incorporación. Sin embargo, en los últimos ensayos, la incubación se prolongó 45-60 minutos sin análisis de cinética, puesto que estos tiempos correspondían aproximadamente a los puntos de mayor incorporación, teniendo en cuenta los resultados anteriores.

Debe enfatizarse que en la conducción de estas experiencias existe un factor limitante, que es la corta vida media del ^{32}P , de 14,3 días.

Con respecto a la siembra puntual de ADN, se debe hacer notar que en los primeros casos se realizó con dos diferentes cantidades, mientras que en el de secuencias repetitivas sólo se obtuvieron los híbridos correspondientes a una sola siembra, debido a dificultades experimentales (figura 6). Ello no invalida las observaciones realizadas, puesto que el propósito del análisis doble de cada fracción obedeció al desconocimiento de la sensibilidad del método, y afortunadamente, el caso mencionado fue comprendido dentro de límites aceptables.

En relación al procedimiento de transferencia de fragmentos de restricción a filtro de nitrocelulosa, se controló en cada caso su eficiencia por tinción del gel una vez finalizada.

Se constató la alta eficiencia de la transferencia, por la muy escasa cantidad de ADN remanente, localizado próximo al origen. Ello se debe a que los fragmentos de mayor longitud son transferidos con menor eficiencia (155), mientras que los más pequeños lo hacen más rápido. Por otra parte, la masa de grandes fragmentos es mayor, y fijan más colorante. Este efecto no pudo ser eliminado por aumento del tiempo de transferencia (18 hs) empleado por primera vez (IIIA.2.1.). En aquellos ensayos (IIIA.2.2. y IIIB.1.2.) ensayos en los cuales se realizó durante 36 horas como mínimo, se observaron resultados similares. Esta pequeña retención en el gel fue despreciada de todas maneras, puesto que fue estadísticamente igual para las muestras normales y neoplásicas, no interfiriendo su posterior comparación.

El dextrán-sulfato es un hiperpolímero, que favorece la formación de redes entre los fragmentos de ADN, reduciendo por tanto los tiempos de incubación requeridos en hibridaciones moleculares (155). Por tal motivo fue incluido en los primeros ensayos (IIA.1., IIA.2.1.). Sin embargo, podría haber contribuido al efecto de fondo observado en el primer

análisis de patrones de restricción. Posiblemente, fragmentos en el filtro afines, hibridaron parcialmente con secuencias del ADN normal no radiactivo incluido en la incubación. A su vez, estos pudieron arrastrar consigo radiactividad proveniente de la sonda, por la formación de las redes mencionadas.

Es así que para evitar el enmascaramiento de hibridaciones propias de ADN tumoral, y dadas las mayores actividades específicas de las sondas obtenidas reduciendo el tiempo requerido, el dextrán-sulfato fue omitido en los siguientes ensayos (IIIA.2.2. y IIIB.1.2.)

Es necesario tener en consideración que la nomenclatura empleada en el presente estudio, corresponde a definiciones operacionales particulares, que pueden no resultar exactamente equiparables a las utilizadas en la literatura.

La llamada "reasociación a tiempo 0", corresponde a la suma de tres fenómenos (143):

- a) Una fracción menor de ADN que poseen la mayoría de especies moleculares, capaces de unirse a HAP como doble cadena, aunque el valor Cot sea tan pequeño que no permita su reasociación. Se supone que esto ocurre por la existencia de regiones con considerable estructura secundaria dentro de una misma cadena ("foldback").
- b) A bajos Cot ($\approx 10^{-4}$), es posible la real formación de seg-

mentos reasociados aún entre secuencias únicas, particularmente cuando son largos

c) Unión inespecífica de ADN a HAP.

Por tanto, las secuencias invertidas propiamente dichas corresponderían a aquéllas reasociadas a $Cot = 4 \times 10^{-3}$, de las cuales se eliminó totalmente la fracción de "reasociación a tiempo 0" .

Sé determinó experimentalmente que utilizando ADN- ^{32}P reasociado a valor Cot extremadamente bajo, no se retenían en HAP cantidades apreciables de ADN bicatenario. Sin embargo, la correcta evaluación de la fracción reasociada a tiempo 0 requiere controles más complejos (143). Es así que en nuestras manos, las secuencias invertidas corresponden a aquéllas reasociadas a $Cot = 4 \times 10^{-3}$ partiendo de segmentos de 2 Kbp . Pueden incluir además especies no contempladas generalmente (reasociación a tiempo 0), resultando en un rendimiento más elevado.

Asimismo, las secuencias repetitivas empleadas en IIIA.1., corresponden en realidad a las reasociadas a $ECot = 70$ menos las secuencias invertidas. Ello obedeció a la necesidad de eliminar la posible superposición de efectos en los resultados obtenidos. En otras palabras, las diferencias cuantitativas entre ADN normal y tumoral halladas con secuencias "repetitivas" son comparables a aquéllas con secuencias invertidas, pero se puede aseverar de esta mane-

ra que no se debe a que las primeras incluyan a las últimas.

De todos modos, en los casos en que las diferentes secuencias obtenidas de ADN's normales y neoplásicos fueron comparadas entre sí, la adición o sustracción de especies en relación a las descritas en la literatura, fue estadísticamente igual para ambas muestras.

La técnica empleada para la hidrólisis de ADN hasta sus bases constitutivas (II.3.1.4.) fue optimizado para la obtención del mayor rendimiento de pirimidinas (156). Sin embargo, no se puede descartar una mínima desaminación de las citosinas bajo estas condiciones. Ello no invalida su aplicación para el análisis del porcentaje relativo de 5mC, puesto que, nuevamente, para la comparación de los valores hallados en ADN normales y neoplásicos, el rendimiento de cada base en particular, es el mismo en todas las muestras por haber sido hidrolizadas en idénticas condiciones.

En el presente estudio, se investigó la existencia de diferencias a nivel genómico entre células neoplásicas humanas, en relación a su contraparte normal, tomando como modelo el carcinoma mamario.

Como se puntualizó previamente, las evidencias actuales indican que las alteraciones causantes del comportamiento

anómaló en células transformadas, comprometen su programa preestablecido genéticamente. Los cambios fenotípicos observados en el estado transformado, son el reflejo de la actividad génica alterada. Puesto que este fenómeno puede ocurrir por mutación del gen, o por modificación de su patrón de regulación, la búsqueda se orientó en forma preliminar al análisis de diferencias cuantitativas entre ADNs totales, y secuencias invertidas o secuencias repetitivas, de posible función regulatoria (IIIA.1.)

Los resultados obtenidos al respecto, indicaron que la existencia de dichas diferencias sólo puede evidenciarse cuando ADNs de secuencias invertidas y repetitivas se enfrentan a este tipo de sondas.

Este fenómeno responde seguramente al hecho que en esta situación se hallan enriquecidas las familias responsables del fenómeno, mientras que son enmascaradas cuando se estudia el genoma completo.

También se intentó el análisis de las secuencias únicas, que reasocian a valores Cot mayores de 1000, pero como puede observarse en la figura 5, con cada sucesivo paso de reasociación, el ADN-sonda incorpora menor radiactividad. De tal manera, la sonda resultó con una actividad específica muy baja, no pudiendo ser detectada.

Si bien es poco probable, no se puede descartar que las diferencias en el primer estudio se debieran al diferente

tratamiento que recibió la muestra tumoral, la cual fue sometida a dos reasociaciones sucesivas para obtener los dos tipos de secuencias necesarias.

Existen datos en la literatura relacionados de alguna manera con estos hallazgos. Al menos dos oncogenes difieren de sus homólogos normales con respecto a secuencias repetitivas: R. Gallo y col. (158) reportaron que el gen celular c-sis contiene intrones con secuencias Alu, ausentes en el gen viral v-sis. Por otra parte, el oncogen celular mos, parece haber adquirido durante su activación, secuencias invertidas en su extremo 5' (134).

Estas evidencias alentaron el estudio del comportamiento hibridable de los ADN-sonda tumorales con patrones de restricción en lugar de siembras puntuales, con el objeto de obtener mayor información acerca de las diferencias encontradas (IIIA.2.)

La primera serie de ensayos realizados, mostró un comportamiento diferencial entre los ADN normales y neoplásicos, aún frente a ADN-sonda total. Por lo tanto, se ensayó nuevamente el procedimiento, aumentando el número de enzimas de restricción empleado. Asimismo, para acotar el número y tipo de especies en el ADN-sonda, se incluyeron como tales secuencias repetitivas de 300 y 4000 bp. Con el fin de obtener solamente los fragmentos producidos por corte enzimá-

tico, el ADN a digerir no fue previamente fraccionado en forma mecánica, lo cual contribuyó a la obtención de patrones diferentes entre la primera y segunda serie de ensayos al emplear la misma enzima (Eco RI o Hae III). Por inconvenientes experimentales, la detección de híbridos formados con algunos de los digeridos no fue adecuada, omitiéndose su inclusión en las figuras 19, 20 y 21. No obstante, utilizando esta metodología, fue posible visualizar la presencia de diferencias cuali y/o cuantitativas entre las muestras provenientes de tejido normal o de carcinoma mamario.

Las técnicas hasta aquí desarrolladas, han permitido determinar la existencia de diferencias genómicas en células tumorales con respecto a su contraparte normal.

Sin embargo, el aislamiento y caracterización de las porciones del genoma responsables del fenómeno de transformación celular, requiere la aplicación de ensayos de transfección con ADN exógeno, y la posibilidad de clonar segmentos específicos, mediante el empleo de estrategias de ingeniería genética. De esta forma, durante los últimos años, se ha podido aislar, y en muchos casos secuenciar y determinar la localización cromosómica de aproximadamente 20 oncogenes.

A pesar de no haberse empleado técnicas de tan alta selectividad, es evidente en los presentes ensayos, la

presencia de diferencias a nivel genómico, que de alguna manera confirman para el modelo mamario humano, y desde un enfoque diferente, los hallazgos efectuados sobre otros sistemas, con metodologías más sofisticadas

El hecho de no contar con las facilidades adecuadas para el desarrollo de este tipo de tecnologías, dificultó la posibilidad de profundizar las investigaciones en este sentido. Por este motivo, y frente a los interesantes resultados obtenidos en relación a los digeridos con Sma I en las figuras 19 y 20, se dirigió entonces la atención hacia el estudio de la metilación del ADN en células neoplásicas. Al enfrentar los digeridos de Sma I con ADN-sonda homólogo de secuencias invertidas o totales, pudo observarse una disminución de fragmentos de alto peso molecular en las muestras tumorales con respecto a las normales. Ello pudo deberse a un aumento de los sitios de restricción para Sma I en el tejido neoplásico, o a una disminución del número de citosinas metiladas, puesto que la enzima corta la secuencia C-C-C-G-G-G, pero no C-C-5mC-G-G-G. Una tercera posibilidad es que el ADN normal haya sido digerido parcialmente. Sin embargo, tres hechos contradicen esta última hipótesis:

a) Alícuotas de los digeridos con Sma I resueltas electroforéticamente en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, no mostraron diferencias tan evidentes al visualizarlos con luz ultravioleta.

b) El empleo de ADN-sonda heterólogos tampoco revela una banda tan notoria en ADN de origen normal.

c) Ambas muestras, normal y tumoral, fueron purificadas, digeridas y analizadas en forma paralela y en idénticas condiciones.

La influencia de la metilación de ADN sobre funciones tales como la diferenciación, división celular y regulación de la expresión génica, sugiere una posible relación entre el grado y/o distribución de los residuos de 5mC y la oncogénesis. Ello es inmediato, considerando que las antedichas son algunas de las funciones más frecuente y dramáticamente alteradas en células transformadas.

Al respecto, R. Holliday propuso en 1979 (159) una teoría por la cual es posible interpretar la carcinogénesis como el resultado de anormalidades a nivel de la metilación de ADN. Basándose en el hecho que la probabilidad de mutación es generalmente mucho menor que la frecuencia de transformación para células murinas, inversamente a lo que ocurre en células humanas, mientras que en ambas la frecuencia de mutación esperada es semejante, postula que la aparición del fenotipo transformado puede deberse a cambios epigenéticos.

H. Rubin por otra parte, también es partidario de esta afirmación (160).

Apoya esta idea el fenómeno de reversión de células neoplásicas al fenotipo normal, observado "in vitro" e "in vivo"

en ausencia de mutación.

Se sugiere entonces que un daño al ADN (acción de carcinógenos, radiación UV) seguido por un mecanismo de reparación por escisión, producen los cambios epigenéticos en la expresión génica responsables de la transformación celular, siempre que ocurran inmediatamente antes o después de síntesis de ADN. La metilación de secuencias adyacentes a un gen determinaría su transcripción. La reparación del ADN puede provocar la desmetilación de la cadena re-sintetizada, y producir una expresión aberrante, que es heredable, pero también potencialmente reversible. Así, la probabilidad de cambios epigenéticos en la actividad génica dependería de la actividad de enzimas metilantes, la cinética de reparación por escisión, y el grado de división celular de un tejido o tipo celular en particular.

La teoría de Holliday no excluye aquélla que atribuye a las mutaciones la causa de la transformación, pero sí justifica los casos en los cuales no es aplicable.

Por otra parte, carcinógenos tales como benzo(a)pireno, nitrosometil-urea, mostazas nitrogenadas, luz ultravioleta (161) y etionina (162) producen hipometilación del ADN en forma comprobada.

Por lo tanto, la disminución de la metilación en células neoplásicas puede ser considerada como una causa primaria, causa secundaria, o un efecto en la carcinogénesis, y ha

sido objeto de estudio por diversos laboratorios. Sin embargo, la mayor parte de los ensayos se han realizado en cultivos celulares, y existen pocos datos sobre lo que ocurre en tumores primarios humanos (129, 163, 164)

Los resultados presentados en la sección destinada al estudio de la metilación en ADN (IIIB), indican que el tejido mamario tumoral se halla hipometilado con respecto al tejido normal, mientras que ADN proveniente de la línea celular T47D presenta el menor grado de metilación.

Esta afirmación surge por una parte, del análisis densitométrico de los perfiles de restricción obtenidos por digestión con las endonucleasas Hpa II y Msp I (figuras 24, 25, 28 y 29. Los patrones de restricción fueron visualizados empleando dos estrategias diferentes : a) tinción del gel con bromuro de etidio y fotografía; b) Autorradiografía de híbridos formados por hibridación de ADN tumoral sonda con fragmentos de restricción transferidos a filtros de nitrocelulosa.

En sendos trazados densitométricos pudo definirse que los segmentos conteniendo C-5mC-G-G están fundamentalmente representados por la población de alto peso molecular en los digeridos de Hpa II, los cuales seguramente son clivados por Msp I, y contribuyen al aumento de especies de menor tamaño molecular en su gráfica correspondiente. Por ambos métodos antedichos, se determinó que los fragmentos conteniendo

la secuencia de reconocimiento metilada, se hallan en mayor proporción en ADN normal, intermedia en ADN tumoral, y menor en ADN de T47D. No obstante, no se puede descartar la presencia de poblaciones hipermetiladas en ADN tumoral, como se observa en la figura 25 por el leve desplazamiento de su trazado hacia el origen en las especies de mayor tamaño, y la absorbancia aumentada de segmentos de tamaño intermedio en el perfil de Hpa II (panel A), no evidente en el de Msp I (panel B). Sin embargo, es difícil interpretar el significado en estas gráficas, del aumento o disminución de segmentos de peso molecular intermedio, puesto que pueden provenir de una mayor digestión de especies mayores, o de una inhibición del corte responsable de segmentos más pequeños.

Las diferencias entre los patrones visualizados por las dos estrategias empleadas, podría haberse debido a la utilización de pares de biopsias provenientes de diferentes pacientes. Sin embargo, no se esperan variaciones individuales tan dramáticas en este tipo de análisis. Por otra parte, el ADN de la misma línea celular T47D exhibió diferentes trazados cuando se estudió por estos dos métodos alternativamente. Por lo tanto, es más probable que estas variaciones se deban al fundamento de la técnica de detección en sí: Tanto el ADN transferido al filtro de nitrocelulosa, como el ADN-sonda son secuencias totales. Consecuentemente, contienen mayor proporción de secuencias repetiti-

vas que únicas. Bajo las mismas condiciones experimentales de incubación, se espera que las primeras hibriden con mayor facilidad que las últimas. Así, la técnica de hibridación molecular podría estar "seleccionando" la detección de secuencias repetitivas con una señal más intensa que la de secuencias únicas, mientras que la tinción con bromuro de etidio no.

La comparación de los resultados obtenidos con la línea celular T47D indicaría un aumento de los sitios C-C-G-G puesto que sus trazados se mantienen por debajo de los correspondientes a ADN tumoral, tanto en digeridos de Hpa II (panel C), como de Msp I (panel D). Habiendo sembrado cantidades idénticas de ADN de cada muestra en el gel de agarosa, se asume que la disminución de material correspondiente a la línea celular en ambos perfiles, es consecuencia de su digestión hasta fragmentos muy pequeños, que migraron fuera del gel.

La duplicación y aneuploidía son fenómenos frecuentemente descritos para líneas celulares (165). Las ocurridas en ésta en particular, pudieron involucrar probablemente, fragmentos conteniendo la secuencia de reconocimiento común a Hpa II y Msp I en su estado desmetilado. Ello explicaría no sólo el aumento de sitios de corte para ambas, sino también una disminución de la cantidad de citosinas metiladas sobre las totales. Las secuencias ricas en GC se

encuentran distribuídas no al azar dentro del genoma, por lo que es de esperar que este efecto sea más notorio al emplear la hibridación molecular como método de detección de los patrones de restricción.

Los datos resultantes del estudio densitométrico de los patrones de restricción concuerdan con los contenidos relativos de 5mC analizados por HPLC (tabla VIII). Los niveles de 5mC en tejido normal ($5,03\% \pm 0,45$) fueron mayores que los correspondientes a tejido tumoral ($3,25\% \pm 0,28$), mientras que el ADN de la línea T47D resultó poseer el menor contenido ($1,63\% \pm 0,30$).

Niveles relativos de 5mC en ADN de líneas celulares, menores que en tejido, han sido descriptos (128 a 130), aunque existen discrepancias en este sentido (166), debidas probablemente a los diferentes métodos y fuentes de ADN empleados. El establecimiento de una línea celular conduce a cambios en el ADN tales como rearreglos, duplicaciones, deleciones, y aún desmetilación (167). Los datos sobre la metilación del ADN utilizando como modelo el cultivo celular deben ser pues considerados cautelosamente, puesto que quizás no reflejen lo que ocurre "in vivo" en relación a este fenómeno. Los datos aquí presentados serían prueba de ello, al menos en el ejemplo de carcinoma mamario.

Por otra parte, los hallazgos reportados en el presente estudio, coinciden con los escasos resultados descrip-


tos para otros tumores humanos, ya que en colon y pulmón se encontró una menor metilación del tejido tumoral con respecto al normal (129, 164).

Dado que la hipometilación se asocia con un aumento de la expresión génica, los datos aquí expuestos concuerdan con la hipótesis de la desrepresión de ciertos genes celulares en relación con el proceso de transformación celular.

En suma, en el presente estudio, se ha demostrado la existencia de diferencias genómicas entre células mamarias humanas normales y neoplásicas. Estas diferencias se encuentran ya sea a nivel de cambios en las bases de determinadas secuencias genómicas, como a nivel de su modificación epigenética por metilación en residuos de citosina.



Lic. Nora Rosemblit



Dr. Alberto Baldi

V. REFERENCIAS

- 1.- Huggins C., Grand L.C., Brillantes F.P. (1961)
Nature 189: 204-207.
- 2.- Burch P.R.J. (1976) The Biology of Cancer: A new
approach. MTP Press Ltd., Inglaterra.
- 3.- La Fond R.E. (1978) Cancer, the outlaw cell.
American Chemical Society, Washington.
- 4.- Knudson A.G. (1979) N. England Journal of Medicine
301: 606-607.
- 5.- Knudson A.G. (1981) En: Genes, Chromosomes and Neoplasia.
Arrighi F.E., Rao P.N., Stubblefield E. eds.
pp 453-462. Raven Press, New York.
- 6.- German J. (1983) Chromosome mutation and Neoplasia.
Alan R. Liss Inc. New York.
- 7.- Comings D.E. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
70: 3324-3328.
- 8.- Huebner R.J., Todaro G.J. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 64: 1087-1094.
- 9.- Todaro G.J., Huebner R.J. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 69: 1009-1015.
- 10.- Temin H.M. (1976) Science 192: 1075-1080.

- 11.- Bishop J.M. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 35-88.
- 12.- Weiss R., Teich N., Varmus H.E., Coffin J. (1982).
RNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor, New York.
- 13.- Houck C.M., Rinehart F.P., Schmid C.W. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 518: 37-52.
- 14.- Jelinek W.R., Schmid C.W. (1982) Ann. Rev. Biochem.
51: 813-844.
- 15.- Schmid C.W., Deininger P.L. (1975) Cell 6: 345-358.
- 16.- Saunders G.F., Shirakawa S., Saunders P.P., Arrighi F.E.,
Hsu T.C. (1972) J. Mol. Biol. 63: 323-334.
- 17.- Britten R.J., Kohne D.E. (1968) Science 161: 529-540.
- 18.- Gall J.G., Cohen E.H., Atherton D.D. (1973) Cold Spring
Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 417-421.
- 19.- Varley J.M., Mc Gregor H.C., Nardi I., Andrews C.,
Erba H.P. (1980) Chromosoma 80: 289-307.
- 20.- Varley J.M., Mc Gregor H.C., Erba H.P. (1980) Nature
283: 686-688.
- 21.- Diaz M.O., Barsacchi-Pilone G., Mahon K.H., Gall J.G.
(1981) Cell 24: 649-659.
- 22.- Stephenson E.C., Erba H.P., Gall J.G. (1981) Cell
24: 639-647.

- 23.- Houck C.M., Rinehart F.P., Schmid C.W. (1979)
J. Mol. Biol. 132: 289-306.
- 24.- Rubin C.M., Houck C.M., Deininger P.L., Friedman T.,
Schmid C.W. (1980) Nature 284: 372-374.
- 25.- Schmid C.W., Jelinek W.R. (1982) Science 216: 1065-1070.
- 26.- Ullu E. (1982) TIBS J. 7: 216-219.
- 27.- Jagadeeswaran P., Forget B.G., Weissman S.M. (1981)
Cell 26: 141-142.
- 28.- Adams J.W., Kaufman R.E., Kretschner P.J., Harrison M.,
Nienhuis A.W. (1980) Nucleic Acid Res. 8: 6113-6128.
- 29.- Wyman A.R., White R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 77: 6754-6758.
- 30.- Wilson D.A., Thomas C.A. (1974) J. Mol. Biol. 84: 115-144.
- 31.- Jelinek W.R., Evans R., Wilson M., Salditt-Georgieff M.,
Darnell J.E. (1978) Biochemistry 17: 2776-2783.
- 32.- Brown S.D.M., Dover G. (1981) J. Mol. Biol. 150: 441-456.
- 33.- Tooze J. (1983) The Molecular Biology of Tumor Viruses
Cold Spring Harbor, New York.
- 34.- Gross L. (1970) Oncogenic Viruses, Pergamon Press,
New York.

- 35.- Bishop J.M. (1983) Ann. Rev. Biochem. 52: 301-354.
- 36.- Duesberg P.H. (1983) Nature 304: 219-226.
- 37.- Weinberg R.A. (1982) Adv. Cancer Res. 36: 149-163.
- 38.- Baldi A., Rosembliit N. (1983) Bases Moleculares del
Proceso de Carcinogénesis. Ciencia e Investigación
(en prensa).
- 39.- Rigby P.W.J. (1981) Nature 290: 186-187.
- 40.- Holliday R., Pugh J.E. (1975) Science 187: 226-232.
- 41.- Sager R., Kitchin R. (1975) Science 189: 426-433.
- 42.- Luria S.E., Human M.L., (1952) J. Bacteriol. 64: 557-569.
- 43.- Luria S.E. (1953) Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.
18: 237-243.
- 44.- Warren R.A.J. (1980) Ann. Rev. Microbiol. 34: 137-158.
- 45.- Hall R.H. (1970) En: The Modified Nucleosides in
Nucleic Acids. pp 281-294, Columbia University, New York.
- 46.- Vanyushin B.F., Tkacheva S.G., Belozersky A.N. (1970)
Nature 225: 948-949.
- 47.- Vanyushin B.F., Mazin A.L., Vasilyev A.N., Belozersky
A.N. (1973) Biochim. Biophys. Acta 299: 397-403.

- 48.- Bird A.P., Taggert M.H. (1980) Nucleic Acid Res. 8: 1485-1497.
- 49.- Ehrlich M., Wang R.Y.H. (1981) Science 212: 1350-1357.
- 50.- Groot G.S.P., Kroon A.M. (1979) Biochim. Biophys. Acta 564: 355-357.
- 51.- Evans H.H., Evans T.E. (1970) J. Biol. Chem. 245: 6436-6441.
- 52.- Burton W.G., Grabowy C.T., Sager R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1390-1394.
- 53.- Royer H.D., Sager R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5794-5798.
- 54.- Sager R., Grabowy C., Sano H. (1981) Cell 24: 41-47.
- 55.- Grippo P., Iaccarino M., Parisi E., Scarano E. (1968) J. Mol. Biol. 36: 195-208.
- 56.- Browne M.J., Burdon R.H. (1977) Nucleic Acid Res. 4: 1025-1037.
- 57.- Roy P.H., Weissbach A. (1975) Nucleic Acid Res. 2: 1667-1684.
- 58.- Naveh-Manly T., Cedar H. (1981) Proc. Natl Acad. Sci. USA 78: 4246-4250.
- 59.- Gruenbaum Y., Cedar H., Razin A. (1982) Nature 295: 620-622.

- 60.- Cedar H., Solage A., Glaser G., Razin A. (1979)
Nucleic Acid Res. 6: 2125-2132.
- 61.- Bird A.P. (1978) J. Mol. Biol. 118: 49-60.
- 62.- Drahovsky D. Bohem T.L.J., Kreis W. (1979) Biochim.
Biophys. Acta 563: 28-35.
- 63.- Deumling B. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:
338-342.
- 64.- Salomon R., Kaye A.M., Hertzberg M. (1969) J. Mol.
Biol. 43: 581-592.
- 65.- Schreck R.R., Erlanger B.F., Miller O.J. (1977)
Exp. Cell Res. 108: 403-411.
- 66.- Lubit B.W., Pham T.D., Miller O.J., Erlanger B.F.
(1976) Cell 9: 503-509.
- 67.- Sano H., Sager R. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
79: 3584-3588.
- 68.- Reilly J.G., Braun R., Thomas C.A. (1980) FEBS lett.
116: 181-184.
- 69.- Gerlach W.L., Bedbrook J.R. (1979) Nucleic Acid Res.
7: 1869-1886.
- 70.- Gold M., Hurwitz J. (1963) Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. 28: 149-156.
- 71.- Waalwijk C., Flavell R.A., (1978) Nucleic Acid Res.
5: 4631-4641.

- 72.- McGhee J.D., Ginder G.D. (1979) Nature 280: 419-420.
- 73.- Mandel J.L., Chambon P. (1979) Nucleic Acid Res.
7: 2081-2090.
- 74.- Pollack Y., Stein R., Razin A., Cedar H. (1980)
Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: 6463-6467.
- 75.- Stein R., Gruenbaum Y., Pollack Y., Razin A., Cedar H.
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 61-65.
- 76.- Gunthert U., Schwiger M., Stupp M., Doerfler W. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3923-3927.
- 77.- Gjerset R.A., Martin D.W. (1982) J. Biol. Chem.
257: 8581-8583.
- 78.- Gruenbaum Y., Szyf M., Cedar H., Razin A. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4919-4921.
- 79.- Salser W. (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
22: 985-1002.
- 80.- Wang R.Y.H., Gehrke C.W., Ehrlich M. (1980) Nucleic
Acid Res 8: 4777-4790.
- 81.- Bird A.P. (1980) Nucleic Acid Res. 8: 1499-1504.
- 82.- Lien-Lu A., Clark S., Modrich P. (1983) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 80: 4639-4643.
- 83.- Solage A., Cedar H. (1978) Biochemistry 17: 2934-2938.

- 84.- Ehrlich M., Ehrlich K., Mayo J.A. (1975) Biochem. Biophys. Acta 395: 109-119.
- 85.- Sano H., Sager R. (1980) Eur. J. Biochem 105: 471-480.
- 86.- Wang A.H.J. (1979) Nature 282: 680-686.
- 87.- Behe M., Felsenfeld G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1619-1623.
- 88.- Felsenfeld G., McGhee J. (1982) Nature 296: 602-203.
- 89.- Huang L-H., Wang R., Gama-Sosa M.A., Shenay S., Ehrlich M. (1984) Nature 308: 293-295.
- 90.- Ball D.J., Gross D.S., Garrard W.T., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5490-5494.
- 91.- Gottesfeld J., Garrard W.T., Bagi G., Wilson R.J., Bonner J. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 2193-2197.
- 92.- Egan P.A., Levy-Wilson B. (1981) Biochemistry 20: 3695-3702.
- 93.- Weisbrod S., Weintraub H. (1981) Cell 23: 391-400.
- 94.- Fisher E.F., Caruthers M.H. (1979) Nucleic Acid Res. 7: 401-416.
- 95.- Desrosiers R.C., Mulder C., Fleckenstein B. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3839-3843.
- 96.- Kaye A.M., Winocour E. (1967) J. Mol. Biol. 24: 475-478.

- 97.- Low M., Hay J., Keir H.M., (1969) J. Mol. Biol. 46:
205-207.
- 98.- Ford J.P., Coca-Prados M., Hsu M.T. (1980) J. Biol.
Chem. 255: 7544-7547.
- 99.- Cohen J.C. (1980) Cell 19: 653-662.
- 100.- Guritaka R.V., Rao P.Y., Mitsialis S.A., Katz R.
(1980) J. Virology 34: 569-572.
- 101.- Vardimon L., Kressmann A., Cedar H., Maechler M.,
Doerfler W. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:
1073-1077.
- 102.- Fradin A., Manley J.L., Prives C.L. (1982) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 79: 5142-5146.
- 103.- Bird A.P. (1984) Nature 307: 503-504.
- 104.- Stein R., Razin A., Cedar H. (1982) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 79: 3418-3422.
- 105.- McLeod D., Bird A.P. (1983) Nature 306: 290-293.
- 106.- Niwa O., Sugahara T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 6290-6294.
- 107.- Groudine M., Eisenman R. Weintraub H. (1981) Nature
292: 311-317.
- 108.- Mermod J.J., Bourgeois S., Defer N., Crépin M. (1983)
Proc. Natl Acad. Sci. USA 80: 110-114.

- 109.- Graessmann M., Graessmann A., Wagner H., Werner E.,
Simon D. (1983) Proc. Natl Acad. Sci. USA 80:
6470-6474.
- 110.- McGhee J.D., Wood W.I., Dolan M., Engel J.D., Felsenfeld
G. (1981) Cell 27: 45-55.
- 111.- Van der Ploeg L.H.T., Flavell R.A. (1980) Cell 19:
947-958.
- 112.- Busslinger M., Hurst J., Flavell R.A. (1983) Cell
34: 197-206.
- 113.- Reitz M.S., Mann D.L., Eiden M., Trainor C.D., Clarke
M.F. (1984) Mol. Cell. Biol. 4: 890-897.
- 114.- Kuo M.T., Iyer B., Wu J.R., Lapeye J.M., Becker F.F.
(1984) Cancer Res. 44: 1642-1647.
- 115.- Harris M. (1982) Cell 29: 483-492.
- 116.- Compere S.J., Palmiter R.D. (1981) Cell 25: 233-240.
- 117.- Razin A., Riggs A.D. (1980) Science 210: 604-610.
- 118.- Gautsch J.W., Wilson M.C. (1983) Nature 301: 32-37.
- 119.- White R., Parker M. (1983) J. Biol. Chem. 258:
8943-8948.
- 120.- Grainger R.M., Hazard-Leonards R.M., Samaha F., Hougan
L.M., Rusk M.R., Thomsen G.H. (1983) Nature 306: 88-91.

- 121.- Wilks A.F., Cozens P.J., Mattaj I.W., Jost J.P. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4252-4255.
- 122.- Folger K., Anderson J.N., Ayward M.A., Shapiro D.J.
(1983) J. Biol. Chem. 258: 8903-8914.
- 123.- Geiser M., Mattaj I.W., Wilks A.F., Seldram M., Jost J.P.
(1983) J. Biol. Chem. 258: 9024-9030.
- 124.- Rogers J., Wall R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
78: 7497-7501.
- 125.- Cate R.L., Chick W., Gilbert W. (1983) J. Biol. Chem.
258: 6645-6652.
- 126.- Stein R., Sciaky-Gallili N., Razin A., Cedar H. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2422-2426.
- 127.- McKeon C., Ohkubo H., Pastan I., de Combrughe B.
(1982) Cell 29: 203-210.
- 128.- Ehrlich M., Gama Sosa M.A., Huang L.H., Midgett R.M.,
Kuo K.C. (1982) Nucleic Acid Res. 10: 2709-2721.
- 129.- Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) Science 301: 89-92.
- 130.- Diala E.S., Chea M.S.C., Rowitch D., Hoffman R.M.
(1983) J. Natl. Cancer Inst. 71: 755-765.
- 131.- Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg A.,
Papageorge A.G., Scolnik E.M., Dhar R., Lowy D.R.,
Chang E.H. (1982) Nature 300: 143-148.

- 132.- Reddy., Reynold R.K., Santos E., Barbacid M. (1982)
Nature 300: 149-152.
- 133.- Taparowsky E., Suard Y., Fasano O., Shimizu K.,
Goldfarb M., Wigler M. (1982) Nature 300: 762-764.
- 134.- Rechavi G., Givol D., Canaani E. (1982) Nature 300
607-611.
- 135.- Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson I., Patterson D.,
Gallo R.C., Croce M.C. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 79: 7824-7827.
- 136.- Creusot F., Acs G., Christman J.K. (1982) J. Biol.
Chem. 257: 2041-2048.
- 137.- Seman G., Myers B., Williams W.C., Gallagher H.S.,
Dmochowski L. (1969) Texas Rept. Biol. Med.
27: 839-866.
- 138.- Sarkar N.H., Charney J., Moore D.H. (1969) J. Natl.
Cancer Inst. 43: 1275-1288.
- 139.- Schlom J., Spiegelman S., Moore D.H. (1971) Nature
231: 97-100.
- 140.- Schlom J., Spiegelman S. (1971) Science 174: 840-843.
- 141.- Schlom J., Spiegelman S., Moore D.H. (1972) Science
175: 542-544.
- 142.- Lane M.A., Sainten A., Cooper G.M. (1981) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 78: 5185-5189.

- 143.- Britten R.I., Graham D.E., Neufeld B.R. (1974) Methods in Enzymology 29: 363-418.
- 144.- Khone D.E. (1970) Quaterly Rev. Biophys 33: 327-375.
- 145.- Bernardi G. (1971) Methods in Enzymology 21: 95-139.
- 146.- Wiegand R.C., Godson G.N., Radding C.M. (1975) J. Biol. Chem. 250: 8848-8855.
- 147.- Southern E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- 148.- Rigby P.W.J., Dieckman M., Rhodes C., Berg P. (1977) J. Mol. Biol. 113: 237-251.
- 149.- Nathans D., Smith H.O. (1975) Ann.Rev.Biochem. 44: 273-293.
- 150.- Azcurra J.M., Lacoste C.H., Capasso J.M. (1978) Acta Physiol. Latinoam. 28: 163-169.
- 151.- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., McDonald J.R., Rutter W. J. (1979) Biochemistry 18: 5294-5298.
- 152.- Southern E.M. (1979) Methods in Enzymology 68: 152-176.
- 153.- Thomas P.S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201-5205.
- 154.- Stafford D.W. Bieber D. (1975) Biochim. Biophys. Acta 378: 18-21.

- 155.- Wahl G.M., Stern M., Stark G.R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3683-3687.
- 156.- Wyatt G.R. (1951) Biochem. J. 48: 584-590.
- 157.- Wakisaka A., Kurosaka K., Okuhara E. (1979) J. Chromatogr. 162: 319-326.
- 158.- Dalla Favera R., Gelmann E.P., Gallo R.C., Wong-Staal F. (1981) Nature 292: 31-35.
- 159.- Holliday R. (1979) Br. J. Cancer 40: 513-522.
- 160.- Rubin H. (1983) Science 219: 1170-1170.
- 161.- Wilson V.L., Jones P.A. (1983) Cell 32: 239-246.
- 162.- Bohem T.L.J., Drahovsky D. (1981) Cancer Research 41: 4101-4106.
- 163.- Flatau E., Bogenmann E., Jones P.A. (1983) Cancer Res. 43: 4901-4905.
- 164.- Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 47-54.
- 165.- Willmer E.N. (1965) Cells and Tissues in Culture. Methods, Biology and Physiology. Academic Press, New York.
- 166.- Diala E.S., Plent M.M., Coalson D.W., Hoffman R.M. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107: 19-26.
- 167.- Wilson V.L., Jones P.A. (1983) Science 220: 1055-1057.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A : adenina

A₂₆₀: absorbancia (densidad óptica) a 260 nanometros

A₂₈₀: absorbancia (densidad óptica) a 280 nanometros

A.E.: actividad específica

ADN : ácido desoxirribonucleico

ADNasa: desoxirribonucleasa

ARN : ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa

5azaC : 5-aza-citidina

bp : pares de bases

BSA: seroalbúmina bovina

C : citosina

Ci : Curie

Cot : Concentración de ADN (moles de nucleótidos/l) x tiempo
de reasociación (segundos)

cpm : cuentas por minuto

ctf : centrifugación

dATP: desoxiadenosina 5'trifosfato

dCTP: desoxicitidina 5'trifosfato

dGTP: desoxiguanidina 5'trifosfato

dTTP: desoxitimidina 5'trifosfato

DTT : ditionitrosol

ECot: Cot equivalente

ABREVIATURAS UTILIZADAS (Continuación)

EDTA : ácido etilén diamino tetracético

G : guanina

HAP : hidroxilapatita

Hmg : grupo de proteínas cromosómicas ácidas de alta movilidad electroforética (high mobility group)

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

IAC : solución de alcohol isoamílico - cloroformo (1:24 v/v)

Kbp : kilo pares de bases

6mA : 6 metil adenina

5mC : 5 metil citosina

mcg : milicentigramos

MDBP : proteína ligadora de ADN rico en 5mC (5mC DNA rich binding protein)

MMTV : virus de tumor mamario murino (mouse mammary tumor virus)

nm : nanometros

PB : buffer fosfato de sodio (cantidades equimoleculares de fosfato de sodio monobásico y dibásico, pH 6,7)

Pipes: piperazina N,N' bis (2-etano) sulfónico

pp : precipitado

rpm : revoluciones por minuto

RT : tiempo de retención

SDS : dodecil sulfato de sodio

sn : sobrenadante

ABREVIATURAS UTILIZADAS (Continuación)

SSC : solución salina-citrato concentrada (NaCl 0,15 M -
citrato de Na 0,015 M)

SV40 : virus de mono 40 (simian virus 40)

T : timina

TCA : ácido tricloro acético

TCN : tiocianato

TEMED : N,N,N',N' tetra metilén diamina

T_m : temperatura media de fusión. Temperatura a la cual el
50% del ADN se halla desnaturalizado (melting temperature)

TNE : solución conteniendo Tris-HCl 50mM - pH 7,8 - EDTA 20 mM
NaCl.

Tris: Tri (hidroximetil) amino-etano.

U.E. : unidad enzimática

u : micro

U.V. : ultravioleta

vol : volumen(es)